

1006 Rec'd PCT/PTO 03 OCT 2005 #8

Atty. Docket No.: 10939/2192

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of: Matsubara, et al.	Examiner: Not Yet Assigned
Serial No.: 10/533,750	
Filed: May 4, 2005	Group Art Unit: Not Yet Assigned
Entitled: Method of Detecting Gene Mutation	Conf. No.: Not Yet Assigned

CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 C.F.R. § 1.8a

I hereby certify that this correspondence (and any paper or fee referred to as being enclosed) is being deposited with the United States Post Office as First Class Mail on the date indicated below in an envelope addressed to Mail Stop PCT, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Nancy Arsenault

Name of Person Mailing Paper

Signature of Person Mailing Paper

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL LETTER

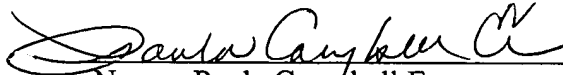
Enclosed for filing the above-identified patent application, please find the following documents:

1. Transmittal of Priority Document;
2. Certified Copy of Japanese Patent Application No. 2002-323419; and
3. Return Post Card.

The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge any fees to Deposit Account No. 16-0085, Reference 10939/2192. A duplicate of this transmittal letter is enclosed for this purpose.

Respectfully submitted,

Date: September 29, 2005



Name: Paula Campbell Evans

Registration No.: 32,503

Customer No.: 29932

Palmer & Dodge LLP

111 Huntington Avenue

Boston, MA 02199-7613

Tel: 617-239-0100

Atty. Docket No.: 10939/2192

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of: Matsubara
Serial No.: 10/533,750
Filed: May 4, 2005
Entitled: Method of Detecting Gene Mutation

Examiner: Not Yet Assigned

Group Art Unit: Not Yet Assigned

Conf. No.: Not Yet Assigned

CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 C.F.R. § 1.8a

I hereby certify that this correspondence (and any paper or fee referred to as being enclosed) is being deposited with the United States Post Office as First Class Mail on the date indicated below in an envelope addressed to Mail Stop PCT, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Nancy Arsenault

Name of Person Mailing Paper

Signature of Person Mailing Paper

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

Dear Sir:

As required by 35 U.S.C. 119(b), Applicants submit herewith a certified copy of Japanese Patent Application No. 2002-323419, from which the above-referenced patent application claims priority.

Respectfully submitted,

Date: September 29, 2005



Name: Paula Campbell Evans

Registration No.: 32,503

Customer No.: 29932

Palmer & Dodge LLP

111 Huntington Avenue

Boston, MA 02199-7613

Tel: 617-239-0100

Date of Filing: November 7, 2002 (Heisei 14)
Japanese Patent Application No. 2002-323419
Reference Number: P-B0250

[Agent]

[Code Number] 100089244

[Attorney]

[Name] Tsutomu TOYAMA

[Selected Agent]

[Code Number] 100090516

[Attorney]

[Name] Hidemi MATSUKURA

[Selected Agent]

[Code Number] 100100549

[Attorney]

[Name] Yoshiyuki KAWAGUCHI

[Phone] 03-3669-6571

[Charge]

[Deposit Number] 012092

[Amount of Payment] ¥21,000

[List of Submissions]

[Name of Submission]	Specification	1
----------------------	---------------	---

[Name of Submission]	Drawings	1
----------------------	----------	---

[Name of Submission]	Abstract	1
----------------------	----------	---

[Proof] Yes

[Name of document] Specification

[Title of the invention] Method of detecting gene mutation

Claims

1. A method of detecting a base sequence, comprising the steps of: amplifying DNA containing a target base sequence to be detected having a mutation site using DNA polymerase; hybridizing the amplified DNA to a hybridization probe having a base sequence complementary to the target base sequence to be detected; and detecting a hybrid formed by the hybridization,

wherein at least one of primers to be used in the DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent, the hybridization probe is labeled with a second labeling agent and contained in a reaction solution for effecting the DNA amplification, the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification, and the hybrid is detected by affinity chromatography with the use of the first and second labeling agents.

2. The method according to claim 1, wherein the mutation site is a point mutation, and the reaction solution for effecting the DNA amplification further contains an unlabeled oligonucleotide having a base sequence different in a single base at the position of the point mutation from the base sequence of the labeled hybridization probe, in an amount sufficient to enhance the specificity of hybridization of the amplified DNA to the hybridization probe.

3. The method according to claim 1 or 2, wherein the DNA amplification is carried out by PCR.

4. A kit comprising: primers for amplifying DNA containing a target base sequence to be detected having a mutation site using DNA polymerase; a hybridization probe having a base sequence complementary to the target base sequence to be detected; and a test

strip for affinity chromatography,

wherein at least one of the primers to be used in the DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent, the hybridization probe is labeled with a second labeling agent, the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification, and the test strip allows of detection of a hybrid of the amplified DNA and the hybridization probe with the use of the first and second labeling agents.

5. The kit according to claim 4, wherein the mutation site is a point mutation and the kit further comprises an unlabeled oligonucleotide having a base sequence different in a single base at the position of the point mutation from the base sequence of the labeled hybridization probe.

6. The kit according to claim 4 or 5, wherein the primers are primers for PCR.

[Detailed explanation of the invention]

[0001]

[Technical field of the invention]

The present invention relates to a method of detecting a base sequence, and more particularly to a method of detecting a base sequence containing a mutation site such as a point mutation, thereby detecting a gene mutation.

[0002]

[Background art]

There exist a number of gene polymorphisms on the genome, which have been considered to be deeply associated with susceptibility to diseases, individual variations in drug metabolism, and the like. The detection of the gene polymorphism is indispensable for so-called tailor-made medicine and becomes one of the most important subjects on the clinical applications of genomic science. Among others, much interest is lately focused on SNP (single nucleotide polymorphism; gene polymorphism caused by substitution of a single base) as a marker of the gene polymorphism, on which huge research funds have been spent

on a global basis. On the other hand, data on gene mutations associated with various genetic diseases has been accumulated into databases by virtue of progress on molecular genetics research. Accordingly, it has become reality to make the diagnosis of genetic diseases or the prediction of clinical categories by screening for known gene mutations already found to be pathogenic on the basis on these databases. In particular, a gene mutation that occurs with high frequency within a certain population or interracially is of great diagnostic value.

[0003]

The gene polymorphism and gene mutation include, for example, a base substitution, deletion, insertion, and variations in the number of repetitive sequences, and among them, a point mutation caused by substitution of a single base makes up the overwhelming majority. A method of simply and quickly detecting a point mutation is indispensable for applying the outcomes of human genome research to clinical purposes.

[0004]

Until now, a variety of methods have been devised for detecting a point mutation (see non-patent reference 1). Typical methods include the allele specific oligonucleotide hybridization (ASO) method, allele specific amplification method, restriction enzyme digestion method, ligase chain reaction, and minisequencing method. These methods require complicated procedures including hybridization or electrophoresis after DNA amplification. On the other hand, the TaqMan method, invader assay, DNA microarray (DNA chip) assay, TOF-MASS method with the use of a mass spectrometer, and the like, which have been recently developed for promoting the human genome analysis and research, are suited to deal with a large number of samples. However, these methods require high-priced, specialized instruments and cannot be easily performed at clinical laboratories. Alternatively, the SSCP method, chemical cleavage method, and DHPLC method are widely used for screening of gene mutations, and are highly effective for broad screening of unknown gene mutations; but are inadequate to reliable detection of a known mutation. In addition, the detection of a point mutation by the use of the sequencing method requires complicated procedures and high expenses, and is of undeniably too much quality for the detection of a known mutation. At present, all of these methods described above involve

special examinations performed at gene research laboratories and find a great difficulty in quick performance in clinical settings (or at bedside).

[0005]

Probes used in the ASO method has been conventionally 15 to 25 mer (see non-patent reference 2). Moreover, it is known that the specificity of a labeled probe for hybridization is enhanced using an oligonucleotide that competes with the probe (see non-patent reference 3).

[0006]

[Non-patent reference 1]

Cotton RGH., Mutation Detection, pp. 1-198, Oxford University Press, Oxford, 1997.

[Non-patent reference 2]

Saiki RK, Erlich HA., Detection of mutations by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes, in "Mutation Detection: A Practical Approach", pp. 113-129, IRL Press, Oxford, 1998.

[Non-patent reference 3]

Nozari G, Rahbar S, Wallace RB., Discrimination among the transcripts of the allelic human α -globin genes α^A , α^S and α^C using oligodeoxynucleotide hybridization probes, Gene, 43:23-28, 1986.

[0007]

[Problem to be solved by the invention]

An object of the present invention is to provide a method of simply and quickly detecting a gene mutation.

[0008]

[Means to solve the problem]

The present inventors have used to achieve the present invention the findings that the use of certain primers and probes under a certain condition enables both amplification and hybridization of nucleic acids in one reaction system, and also enables a easy detection of a hybrid formed by the hybridization.

The present invention provides the following:

[0009]

(1) A method of detecting a base sequence, comprising the steps of: amplifying DNA containing a target base sequence to be detected having a mutation site using DNA polymerase; hybridizing the amplified DNA to a hybridization probe having a base sequence complementary to the target base sequence to be detected; and detecting a hybrid formed by the hybridization,

wherein at least one of primers to be used in the DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent, the hybridization probe is labeled with a second labeling agent and contained in a reaction solution for effecting the DNA amplification, the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification, and the hybrid is detected by affinity chromatography with the use of the first and second labeling agents.

[0009]

(2) The method according to item (1), wherein the mutation site is a point mutation, and the reaction solution for effecting the DNA amplification further contains an unlabeled oligonucleotide having a base sequence different in a single base at the position of the point mutation from the base sequence of the labeled hybridization probe, in an amount sufficient to enhance the specificity of hybridization of the amplified DNA to the hybridization probe.[¥]

[0010]

(3) The method according to item (1) or (2), wherein the DNA amplification is carried out by PCR.

[0012]

(4) A kit comprising: primers for amplifying DNA containing a target base sequence to be detected having a mutation site using DNA polymerase; a hybridization probe having a base sequence complementary to the target base sequence to be detected; and a test strip for affinity chromatography,

wherein at least one of the primers to be used in the DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent, the hybridization probe is labeled with a second labeling agent, the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification, and the test strip

allows of detection of a hybrid of the amplified DNA and the hybridization probe with the use of the first and second labeling agents.

[0013]

(5) The kit according to item (4), wherein the mutation site is a point mutation and the kit further comprises an unlabeled oligonucleotide having a base sequence different in a single base at the position of the point mutation from the base sequence of the labeled hybridization probe.

[0014]

(6) The kit according to item (4) or (5), wherein the primers are primers for PCR.

[0015]

Mode for carrying out the invention

<1> Detection method of the present invention

In the present invention, there is provided a method of detecting a base sequence, which comprises the steps of: amplifying DNA containing a target base sequence to be detected having a mutation site using DNA polymerase; hybridizing the amplified DNA to a hybridization probe having a base sequence complementary to the target base sequence to be detected; and detecting a hybrid formed by the hybridization; characterized in that at least one of primers to be used in the DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent, the hybridization probe is labeled with a second labeling agent and contained in a reaction solution for effecting the DNA amplification, the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification, and the hybrid is detected by affinity chromatography with the use of the first and second labeling agents. Hereinafter, each of the steps will be described.

[0016]

(1) DNA amplification

The DNA amplification is carried out, if using DNA polymerase, without any particular limitation. Any amplification methods comprising the step of synthesizing DNA with the use of DNA polymerase can be employed. Examples of the DNA amplification method include PCR, TMA, NASBA, and LAMP methods.

[0017]

The synthesis of DNA with DNA polymerase requires primers. The primers are designed by a method known in the art depending on an amplification method to be used and a target base sequence to be detected. In the present invention, at least one of primers to be used in DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent.

[0018]

For example, when DNA amplification is effected by the PCR method, a pair of primers are used and at least one thereof is labeled so that the amplified DNA can be labeled. Alternatively, a primer that functions at the stage of DNA synthesis in DNA amplification by the NASBA and TMA methods or at least one of inner primers in DNA amplification by the LAMP method is labeled, thereby allowing the labeling of the amplified DNA.

[0019]

The labeling of primers is carried out so as not to inhibit DNA synthesis reaction. Such labeling can be carried out according to a method known in the art, and a primer is usually labeled at its 5' end.

[0020]

A labeling agent to be used in the labeling may be those to which a corresponding substance can be biospecifically bound. A pair of the labeling agent and the substance biospecifically bound thereto includes an antigen and an antibody, an enzyme and an inhibitor, a sugar chain and lectin, a hormone and a receptor, and a metal-binding protein and a metal element. Specifically, a pair of digoxigenin and an anti-digoxigenin antibody and a pair of biotin and streptavidin may be used. In these pairs, either of the two may be given as a labeling agent. However, the smaller molecular weight partner is generally used as a labeling agent.

[0021]

Primers and DNA amplification conditions to be used are appropriately adjusted on the basis of type of an amplification method and a target base sequence to be detected. For example, see: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.), Volume 2, Chapter 8, pp. 8.1 - 8.126, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001 on the PCR

method; PCR Methods and Applications, 1, 25-33 (1991) on the NASBA method; and Nucleic Acids Research, Vol. 28, No. 12, pp. i-vii (2000) on the LAMP method.

[0022]

Test DNA that functions as a template in DNA amplification can be prepared from a test sample by a conventional method.

[0023]

The target base sequence to be detected is appropriately selected depending on the type of an amplification method so that the target base sequence having a mutation site can be specifically amplified. In general, the mutation site contained in the target base sequence to be detected is known as a site of gene mutation or gene polymorphism. The mutation of the site may be a point mutation, an insertion mutation or a deletion mutation.

[0024]

Common examples of the gene mutation and gene polymorphism to be analyzed by the detection method of the present invention include g727t mutation observed with high frequency in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia; a985g mutation (Lys329Glu mutation) observed with high frequency in Caucasian patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; g1691t mutation (Ser564Ile mutation) of GLDC gene observed with high frequency in Finnish patients with hyperglycinemia, gene polymorphism (CYP2C19*2, g681a) in drug metabolizing enzyme gene CYP2C19 and gene polymorphism (E487K) of an aldehyde dehydrogenase 2 determining individual variations in alcohol metabolism;

[0025]

Glycogen storage disease type Ia is a congenital disorder of carbohydrate metabolism, inherited in an autosomal recessive manner, caused by deficiency of glucose-6-phosphatase in the glycogen metabolic pathway, and leads to an excess accumulation of glycogen mainly in the liver. Patients with glycogen storage disease type Ia are found to have hypoglycemia, hepatomegaly, short stature, renal damage, hyperlipidemia, hyperuricemia, or the like. Mutation g727t in the gene of this enzyme is a highly frequent mutation making up approximately 90% of pathogenic mutations in Japanese cases, and generates aberrant splicing of its mRNA. Although the diagnosis of this disease

has been usually performed until very recently by measuring enzyme activity of liver tissues, the emergence of genetic diagnosis has eliminated the need of liver biopsy. The number of carriers having this mutation in Japanese population is one in about 200 people.

[0026]

Non-ketotic hyperglycinemia is a congenital disorder of amino acid metabolism (autosomal recessive inheritance) caused by deficiency of an enzyme of the glycine cleavage system, and exhibits severe neurological symptoms including neonatal convulsion during neonatal period. Mutation g1691t in GLDC gene of the enzymes in the glycine cleavage system is observed with high frequency (approximately 70% of mutated genes) in Finnish patients. This mutation causes an amino acid substitution of Ser564Ile.

[0027]

Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency is a congenital disorder of organic acid metabolism (autosomal recessive inheritance) caused by deficiency of the enzyme (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD) playing a key role in fatty acid oxidation pathway, and brings about hypoglycemia and consciousness disturbance at fasting and infection. It is known that medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency is often misdiagnosed as sudden infant death syndrome or acute encephalopathy (Reye syndrome). Mutation a985g in the gene of this enzyme is a highly frequent mutation making up approximately 90% of pathogenic mutations in Caucasian cases, and produces an amino acid substitution of Lys329Glu. Moreover, carriers having this gene mutation are found with high frequency in Caucasian population (one in 40 people in the U.K.). In U.S.A. and European countries, the genetic diagnosis of detecting this a985g mutation is widely used for diagnosis of this disease.

[0028]

CYP2C19 gene plays a key role in the metabolism of omeprazole (inhibitor of gastric acid secretion) or the like. CYP2C19*2, a SNP in the gene, shows 681A>G mutation in exon 5, leading to aberrant splicing, and thus finally decreases in the metabolic activity to this drug. An individual having such a polymorphism (poor metabolizer) needs a decreased amount of the drug to be administrated to the subject. Therefore, it is clinically advantageous to determine the genotype of a patient before the medication. This gene

polymorphism is found in approximately 23% of the gene in Japanese population.

[0029]

The gene polymorphism (Glu487Lys) of aldehyde dehydrogenase 2 is a SNP, observed largely in oriental population, to determine individual variations in alcohol metabolism. Because the enzyme having the gene polymorphism is less active to slow down the metabolism of acetaldehyde generated from alcohol, an individual having this polymorphism shows a constitutional "low tolerance for alcohol". Approximately 30% in Japanese population have a heterozygote of this gene polymorphism and approximately 5% have a homozygote thereof.

[0030]

(2) Hybridization

The hybridization of the amplified DNA to a hybridization probe having a base sequence complementary to the target base sequence to be detected may be carried out in the same manner as general hybridization except that a particular hybridization probe is used.

[0031]

The hybridization probe used in the present invention is labeled with a second labeling agent and contained in a reaction solution for effecting the DNA amplification, and the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification.

[0032]

The second labeling agent is defined as described in the first labeling agent; provided that the substance used for it must be different from the first labeling agent. The labeling of the hybridization probe can be carried out by a method known in the art so as not to inhibit the hybridization. The labeling of the hybridization probe is preferably carried out at its 3' end. This is because such labeling prevents the oligonucleotide chain from being extended during the DNA amplification reaction. If the chain is extended in length, the T_m value thereof is increased and thus hybridization may occur even though there are mismatches.

[0033]

The design of the base sequence of the hybridization probe so as not to inhibit the

DNA amplification can be generally selected by adjusting the chain length or the like of the hybridization probe so that the hybridization of the hybridization probe will not occur under the DNA amplification condition.

[0034]

The hybridization probe used in the present invention has a base sequence designed so as not to inhibit the DNA amplification, and can be thus previously contained in a reaction solution for effecting the DNA amplification. Therefore, the reaction solution after the DNA amplification is completed is placed directly under such a condition that the amplified DNA can be hybridized to the hybridization probe, thereby allowing the hybridization thereof.

[0035]

The chain length of the hybridization probe and the condition of hybridization thereof are appropriately selected depending on a method used in the DNA amplification. In DNA amplification with the use of DNA polymerase, because the amplification is effected under a temperature condition suitable to for the DNA polymerase exhibit its activity, the chain length is selected so that the hybridization will not occur at this temperature. In addition, the temperature at which the hybridization occurs is not particularly limited as long as DNA amplification is not inhibited, but is preferably selected so that the generated hybrid may not be dissociated even at room temperature.

[0036]

A specific condition under which the base sequence of the probe does not inhibit the DNA amplification includes a condition that the T_m of the probe is designed to be 25 to 40°C (preferably 30 to 35°C) lower than the T_m of primers.

[0037]

For example, with consideration given to general conditions of the PCR method, the probe should be typically 10-mers to 13-mers. This is much shorter than 15-mer to 25-mer probes (see the above-mentioned non-patent reference 2) that have been conventionally used as a probe for allele specific oligonucleotide hybridization. In the context of that longer probes have been extensively used heretofore, there has been the theory that a sequence of at least about the 15th power of 4 is required for constructing a probe having specificity by

combinations of four different bases in the whole genome sequence (3 billion base pairs). However, this holds true for the case where hybridization is directed toward the whole genome sequences. When hybridization is directed to a PCR-amplified DNA fragment having several hundreds of bases, such length or specificity is not considered necessary for probes that the specificity of hybridization is sufficiently maintained with the former probe as shown above.

[0038]

When using the detection method of the present invention for the detection of any gene mutation or polymorphism, the hybridization probe is required to be adjusted to an optimum chain length. The optimum length can be determined by a standard experimentation, as described in Examples below. Because an extremely short length of a probe is usually used in the detection method of the present invention, formation of a diagnostic line is found to dramatically vary depending on the length variations by a single base. When the emergence of false positive or weak positive reaction is observed, it is preferred that a probe having a shorter or longer length than that of the probe designed based on its T_m value may be constructed to choose the most suitable one. In this respect, because a probe having a normal base sequence and a probe having a mutant base sequence are different in T_m value due to the base substitution even though they have the same chain length, each optimum chain length should be designed independently.

[0039]

It is preferred to design the base sequence of the hybridization probe so that the mutation site will be positioned in approximately middle of the base sequence.

[0040]

Hybridization is usually carried out by increasing a temperature until double-stranded DNA is denatured, followed by gradually lowering the temperature. Thus, the hybridization can be carried out by only a procedure of changing the temperature of a reaction solution in which DNA amplification is completed, without the need of any other procedures. In the case of using a programmable thermal cycler in DNA amplification, a temperature condition for hybridization can be programmed in addition to a temperature condition requisite to the DNA amplification, thereby effecting the amplification and the

hybridization as a series of reactions, after a sample is loaded in the thermal cycler.

[0041]

The use of a short length of the probe designed as described above provides the following three advantages: 1) the difference in T_m values between the case where there is a mismatch of a single base and the case where there is no mismatch can be rendered larger than that of a longer length of a probe, and thus the specificity of the probe can be relatively increased; 2) the hybridization temperature of the probe can be given as low as 25°C in the detection method of the present invention, although conventionally 37 to 65°C, and thus a subsequent series of procedures can be carried out at room temperature; and 3) a short length of the probe has a reduced T_m value and does not hybridize during PCR reaction, and thus the probe does not affect the PCR reaction even though it is previously mixed in the PCR reaction solution. This probe enables the procedures PCR, heat denaturation, hybridization to be carried out as a series of reactions, without performance of additional procedures such as the addition of a reagent during the reactions. These advantages can be similarly obtained in other DNA amplification methods with the use of an extension reaction by DNA polymerase, as in the PCR method.

[0042]

(3) Detection of hybrid

A hybrid formed by the hybridization has both the first labeling agent and the second labeling agent. The hybrid is detected by affinity chromatography with the use of the first and second labeling agents.

[0043]

The affinity chromatography can be carried out with a test strip constructed for this purpose. The detection of a hybrid by affinity chromatography with the use of two different labeling agents can be carried out according to a method known in the art, and a test strip used in this method can be constructed according to a general method.

[0044]

An example of such a test strip is constructed so that a hybrid will be reacted with a substance which is capable to be specifically bound to the first labeling agent and is coupled with a labeling agent (e.g., gold colloid) to become visible when accumulated; and

transferred onto a chromatography support on which a substance capable to be specifically bound to the second labeling agent is immobilized, to allow of the observation of the visible labeling agent when accumulated on that immobilization site. Such a test strip itself has been also used so far in a method of simply detecting a certain gene (J. Clin. Microbio1, 38: 2525-2529, 2000).

[0045]

Hereinafter, an illustration will be provided in a specific case where the first labeling agent is digoxigenin, the second labeling agent is biotin, and the labeling agent that is visible when accumulated is gold colloid. The following sites are placed in the order named in the migration direction of a chromatography solvent (generally, a buffer solution): an immersion site that is immersed in a chromatography solvent to provide the chromatography solvent to the strip of the chromatography support; a complex-carrying site that has a pad carrying an anti-digoxigenin antibody conjugated with gold colloid (a complex) in a manner that this antibody can be released into the chromatography solvent; a sample-applying site to which the reaction solution containing a hybrid is applied; a streptavidin-immobilized site on which a band of streptavidin is immobilized perpendicularly to the migration direction of the chromatography solvent; an antibody-immobilized site on which an antibody against the anti-digoxigenin antibody is immobilized; and an absorption site that has a pad absorbing the chromatography solvent.

This test strip is used as described below. After the reaction solution containing the hybrid is applied to the sample-applying site and the immersion site is immersed in the chromatography solvent, the test strip is removed from the chromatography solvent and left to stand. When the chromatography solvent migrates through the chromatography support by capillary action and reaches the complex-carrying site, from which the chromatography solvent containing the complex will migrate forward. When this chromatography solvent reaches the sample-applied site, the digoxigenin of the hybrid in the applied reaction solution will bind to the anti-digoxigenin antibody of the complex to form the hybrid having the gold colloid, which further migrates forward through the chromatography support by the chromatography solvent. When the hybrid reaches the streptavidin-immobilized site, this hybrid will be accumulated on the streptavidin-immobilized site through the binding of

biotin and streptavidin; consequently a visible signal shall be seen when the hybrid is present. The complex that has passed through the streptavidin-immobilized site is accumulated on the antibody-immobilized site to generate a visible signal showing that the chromatogram has proceeded normally. The chromatography solvent further migrating will be absorbed and held in the absorption site.

[0046]

In the detection method of the present invention, if the mutation site is a point mutation, preferably, the reaction solution for effecting DNA amplification further contains, along with the hybridization probe, an unlabeled oligonucleotide (hereinafter, also referred to as a "competing probe") having a base sequence different in a single base at the position of the point mutation from the base sequence of the labeled hybridization probe, in an amount sufficient to enhance the specificity of the hybridization of the amplified DNA to the labeled hybridization probe.

[0047]

The competing probe is designed in the same way as the hybridization probe except that it differs from the hybridization probe in a single base at the position of the point mutation. The length of the competing probe may be different from that of the hybridization probe.

[0048]

The amount of the competing probe sufficient to enhance the specificity of the hybridization of the amplified DNA to the labeled hybridization probe varies depending on conditions such as the target base sequence to be detected and the base sequence of the hybridization probe, whereas in principle, the competing probe may be usually contained in the range from an equal amount to 5-fold amount (molar ratio) with respect to the amount of the hybridization probe. Nevertheless, when positive reaction is significantly reduced, the omission of the competing probe, if it is confirmed not to cause false positives, may sometimes produce the best result. Because the formation of a diagnostic line is significantly affected by the chain length of the hybridization probe and the presence or absence of the competing probe, an optimum reaction condition will be relatively easily found.

[0049]

The specificity of the hybridization probe can be enhanced and non-specific hybridization can be suppressed by adding an unlabeled competing oligonucleotide in the hybridization.

[0050]

In the detection method of the present invention, different labeling agents may be used for labeling a hybridization probe for detecting a normal base sequence and a hybridization probe for detecting a mutant base sequence, to integrate two reaction systems for detecting a normal base sequence and for detecting a mutant base sequence into one reaction system. That is, the hybridization probes for detecting a normal base sequence and for detecting a mutant base sequence can be differently labeled and mixed together in the ratio of 1:1 to integrate the reaction systems into one while these hybridization probes are allowed to compete with each other. After the reaction, using the complexes of substances which are capable of specifically binding to the labeling agents, respectively, and a labeling agent that becomes visible when accumulated, affinity chromatography is carried out to determine a genotype.

[0051]

The detection method of the present invention has the following advantages: (1) versatility: the method is based on allele specific oligonucleotide hybridization that has been widely used as a detection method for a long time, and therefore adaptable to detection of a wide range of base sequence mutations such as an insertion mutation, a substitution mutation, and a point mutation; (2) rapidity: the determination of a genotype can be carried out within 10 minutes after the amplification and hybridization reactions have been completed in a thermal cycler, and the use of a capillary-type PCR amplification device in the nucleic acid amplification also enables all steps to be completed within 1 hour, if a DNA sample is ready; and (3) simplicity: after PCR reaction, a genotype can be macroscopically determined, thereby eliminating the need for an instrument such as a gel electrophoresis device or a fluorescence detector. A thermal cycler for effecting PCR reaction is a general-purpose instrument for clinical examination, for example, an examination for infectious diseases, and has been already placed in many hospitals. Moreover, the reaction procedure is simple

without the need for special technical skills. The above-described advantages can be also obtained when nucleic acid reactions (TMA, NASBA, LAMP, etc.) other than PCR are used.

[0052]

The principle of the detection method of the present invention will be more fully illustrated in the case using PCR with reference to Figs. 1 to 3.

[0053]

Fig. 1 shows a reaction with the use of normal DNA as a sample. Reaction system 1 is a system to which is added a hybridization probe for detecting a normal base sequence and reaction system 2 is a system to which is added a hybridization probe for detecting a mutant base sequence. In this figure, the black circle represents a normal base, the black triangle represents a mutant base, Dig represents a digoxigenin label, B represents a biotin label, and GP represents a gold particle.

[0054]

At first, a gene site having a point mutation (the target base sequence to be detected) is amplified by PCR. One primer of the PCR primer pair used in this case has been previously labeled at its 5' end with digoxigenin. In a PCR reaction solution, two oligonucleotides (hybridization probe and competing probe) have been mixed with typical components. In this combination of the oligonucleotides, there exist two combinations for detecting a normal base sequence and for detecting a mutant base sequence. In the combination for detecting a normal base sequence, one is an oligonucleotide (normal probe) having a normal base sequence with the point mutation site located in the middle portion thereof and labeled with biotin at its 3' end; and the other is an unlabeled competing oligonucleotide (mutant probe) having a mutant base sequence with the point mutation site located in the middle portion thereof. In the combination for detecting a mutant base sequence, one is an oligonucleotide (mutant probe) having a mutant base sequence with the point mutation site located in the middle portion thereof and labeled with biotin at its 3' end and the other is an unlabeled competing oligonucleotide (normal probe) having a normal base sequence with the point mutation site located in the middle portion thereof. Any of these oligonucleotides are designed to be a reverse strand relative to the PCR primer labeled with digoxigenin.

[0055]

The composition of the PCR reaction solution is, for example, 50 to 100 ng of sample DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 „M each dNTPs, 1 „M PCR forward primer (labeled with digoxigenin at its 5' end), 1 „M PCR reverse primer, 600 nM hybridization probe (labeled with biotin at its 3' end), 3 „M unlabeled competing oligonucleotide, and 1.25 U Taq DNA polymerase, and the amount of the PCR reaction solution is 20 „l. The PCR condition is: for example, heating at 94°C for 2 minutes; 35 cycles of 98°C for 10 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds; followed by 72°C for 3 minutes; 98°C for 3 minutes; 65°C for 1 minute; 55°C for 1 minute; 45°C for 1 minute; 35°C for 1 minute; and 25°C for 1 minute. In this process after the cycle reactions are repeated, a PCR product labeled with digoxigenin is hybridized with oligonucleotide having a base sequence completely complementary to the base sequence of the PCR product. For example, when oligonucleotides for detecting a normal base sequence is used with the DNA having a normal base sequence in combination, a PCR product labeled with digoxigenin and an oligonucleotide labeled with biotin form a hybrid (Fig. 1, reaction system 1). An aliquot (5 „l) of this solution is spotted onto the sample-applying site in a test strip of affinity chromatography, such as DNA detection test strip (Roche, #1-965-484), on which streptavidin is immobilized and in which an anti-digoxigenin antibody labeled with gold colloid is held in a manner that the antibody can migrate, and the bottom end of the test strip is immersed in a buffer for 5 seconds. As the strip is left to stand at room temperature for 5 minutes while the buffer is developed, the anti-digoxigenin antibody labeled with gold colloid binds to the hybrid of the PCR product labeled with digoxigenin and the oligonucleotide labeled with biotin. This hybrid is further captured by streptavidin immobilized on the test strip to form a red line that can be macroscopically observed. On the other hand, when oligonucleotides for detecting a mutant base sequence is used with the DNA having a normal base sequence in combination, a PCR product labeled with digoxigenin and an unlabeled oligonucleotide form a hybrid. After this solution is spotted to the sample-applying site of the test strip and subjected to a development with a buffer, an anti-digoxigenin antibody labeled with gold colloid binds to the hybrid of the PCR product labeled with digoxigenin and the unlabeled oligonucleotide. However, because this hybrid

is not captured by streptavidin on the test strip, a red line is not formed (Fig. 1, reaction system 2). As described above, macroscopically observing a formation of red line in each of the two different reaction systems will make it possible to make a determination of the genotype of DNA given as a sample. The principle of the reaction of DNA having a mutant base sequence is the same as above (Fig. 2).

[0056]

The operation procedures in this aspect are shown in Fig. 3. At first, a DNA as a sample is mixed with a reaction reagent in a PCR tube and heated/cooled with a thermal cycler according to the program to effect the DNA amplification and the formation of a hybrid (Step 1). An aliquot (5 μ l) of the reaction solution is spotted to the sample-applying site of the test strip and the bottom end of the test strip is immersed in a buffer, followed by standing at room temperature (Step 2). After 5 minutes, the diagnosis is conducted on the basis of the presence or absence of the diagnostic line to determine a genotype (Step 3). Whether the affinity chromatography is normally completed or not can be confirmed by examining the presence or absence of a control line.

[0057]

The detection method of the present invention is a method capable of quickly and simply determining the presence or absence of a gene mutation with accuracy and without the use of a special device, and is suitable to conduct a genetic test in a hospital outpatient clinic or at bed side. That is, the detection method allows of a genetic diagnosis as a Point of Care. More particularly, the gene polymorphism of drug-metabolizing enzymes including CYP2C19 will be decided, which made it possible to determine on the spot whether or not a certain drug is suitable for a patient and to assist the adjustment of the dosage. In this case, an important advantage is that a test result can be obtained in a short time.

[0058]

<2> Kit of the present invention

The kit of the present invention comprises: primers for amplifying DNA containing a target base sequence to be detected having a mutation site using DNA polymerase; a hybridization probe having a base sequence complementary to the target base sequence to be

detected; and a test strip for affinity chromatography; characterized in that at least one of the primers to be used in the DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent, the hybridization probe is labeled with a second labeling agent, the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification, and the test strip allows of detection of a hybrid of the amplified DNA and the hybridization probe with the use of the first and second labeling agents. The kit of the present invention can be used for carrying out the detection method of the present invention.

[0059]

The primers, the hybridization probe, and the test strip for affinity chromatography are as described above in the detection method of the present invention.

[0060]

If the mutation site is a point mutation, preferably, the kit of the present invention further comprises an unlabeled oligonucleotide (competing probe) having a base sequence different in a single base at the position of the point mutation from the base sequence of the labeled hybridization probe. This oligonucleotide is as described above in the detection method of the present invention.

[0061]

[Examples]

The present invention will be described in detail with reference to the following examples, which are only intended to concretely illustrate the present invention, but not intend to restrict the scope of the present invention in any way.

[0062]

[Example 1]

Detection of Mutation g727t in Glycogenesis Type Ia

(1) Reaction System and Experimental Procedure

For detecting g727t mutation in glycogenesis Type Ia, primers listed in Table 1 were prepared on the basis of known base sequences around the mutation site.

[0063]

[Table 1]

Primers and probes for detection of g727t mutation in glycogenosis type Ia

PCR forward primer (G6P-E5-1F-Dig):

5'-Dig-CCCAAATCCTTCCTATCTCTCACAG-3' (SEQ ID NO: 1)

PCR reverse primer (G6P-E5-1R(20)):

5'-TGCTGGAGTTGAGAGCCAGC-3' (SEQ ID NO: 2)

[0064]

For examining the effect of chain lengths of probes, oligonucleotides listed in Table 2 were prepared as hybridization probes and competing probes.

[0065]

[Table 2]

(I) Biotin-labeled oligonucleotide for detection of normal base sequence:

17 mer: 5'-AAGCTGAACAGGAAGAA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 3)

15 mer: 5'-AGCTGAACAGGAAGA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 4)

13 mer: 5'-GCTGAACAGGAAG-Biotin-3' (SEQ ID NO: 5)

11 mer: 5'-CTGAACAGGA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 6)

(II) Unlabeled competing oligonucleotide for detection of normal base sequence:

17 mer: 5'-AAGCTGAAAAGGAAGAA-3' (SEQ ID NO: 7)

15 mer: 5'-AGCTGAAAAGGAAGA-3' (SEQ ID NO: 8)

13 mer: 5'-GCTGAAAAGGAAG-3' (SEQ ID NO: 9)

11 mer: 5'-CTGAAAAGGA-3' (SEQ ID NO: 10)

(III) Biotin-labeled oligonucleotide for detection of mutant base sequence:

17 mer: 5'-AAGCTGAAAAGGAAGAA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 11)

15 mer: 5'-AGCTGAAAAGGAAGA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 12)

13 mer: 5'-GCTGAAAAGGAAG-Biotin-3' (SEQ ID NO: 13)

11 mer: 5'-CTGAAAAGGA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 14)

(IV) Unlabeled competing oligonucleotide for detection of mutant base sequence:

17 mer: 5'-AAGCTGAACAGGAAGAA-3' (SEQ ID NO: 15)

15 mer: 5'-AGCTGAACAGGAAGA-3' (SEQ ID NO: 16)

13 mer: 5'-GCTGAACAGGAAG-3' (SEQ ID NO: 17)

11 mer: 5'-CTGAACAGGAA-3' (SEQ ID NO: 18)

[0066]

The PCR reaction solution consists of 50-100 ng of sample DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 „M each dNTPs, 1 „M of PCR forward primer, 1 „M of PCR reverse primer (labeled with digoxigenin at the 5' end), 600 nM of hybridization probe (labeled with biotin at the 3' end), unlabeled competing oligonucleotide at a predetermined concentration, and 1.25 U Taq DNA polymerase in a final volume of 20 „l. The PCR was carried out by heating at 94°C for 2 minutes and repeating 35 times a cycle of 98°C for 10 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, followed by 72°C for 3 minutes, 98°C for 3 minutes, 65°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 45°C for 1 minute, 35°C for 1 minute, and 25°C for 1 minute.

[0067]

An aliquot (5 „l) of the solution was spotted on a sample-applying site of a test strip (DNA Detection Test Strip, Roche Co., Ltd., #1-965-484, an affinity chromatographic test strip on which streptavidin is immobilized and in which an anti-digoxigenin antibody labeled with gold colloid is held in a movable manner) and then the bottom end of the strip was immersed in a buffer for 5 seconds. Then the test strip was left to stand for 5 minutes at room temperature to allow the buffer to move through the strip. After the keeping, the presence or absence of a genotype diagnostic line was macroscopically determined.

[0068]

(2) Examination of Competition with Unlabeled Oligonucleotide

The labeled hybridization probe used was of 17 mers and the detection was then carried out without the addition of a competing probe in a reaction solution. The DNA samples used were a homozygote for g727 allele (normal DNA) and a homozygote for t727 allele (mutant DNA), and the hybridization probes used were those for the detection of a normal base sequence and for the detection of a mutant base sequence. The results are shown in Fig. 4. In this figure, the indications "Wt" and "Mut" with respect to "DNA" represent the normal DNA and the mutant DNA, respectively, while the indications "Wt" and "Mut" with respect to "hybridization probe" represent the hybridization probes for the detection of a normal base sequence and for the detection of a mutant base sequence,

respectively (the same holds for Fig. 5 to Fig. 7 described below).

[0069]

In any of the combinations tested, a false positive red reaction line was recognized. Thus, the genotyping was unsuccessful (Fig. 4, lanes 1-4).

[0070]

A similar experiment was carried out by adding 5 - 50 times more amount (molar concentrations) of the competing probe (17 mers) than that of the hybridization probe to the reaction solution . The results are shown in Fig. 5.

[0071]

The addition of the competing probe resulted in a substantial decrease in false positive reactions. In other words, only very slight red reaction lines were observed in reaction systems of probes for detecting a mutant base sequences with a normal DNA (Fig. 5, lanes 6-8) and in reaction systems of probes for detecting a normal base sequences with a mutant DNA (Fig. 5, lanes 10-12). No difference was found in inhibitory effect on a false positive reaction in any amounts of the competing probe added, and even the addition of 50-fold amount could not completely inhibit the false positive reaction. On the contrary, it was found that the addition of 25-50 fold amounts inhibited normal positive reactions so that the reaction lines would tend to become fairly pale (Fig. 5, lanes 3, 4, 15, and 16).

[0072]

(3) Examination of Chain Length of Hybridization Probe

The hybridization probes and competing probes used in this study were of 17 mers, 15 mers, 13 mers, and 11 mers. The amount of the competing probes added to the reaction solution was fixed to 30 times more than that of the hybridization probe. The results are shown in Fig. 6.

[0073]

In the reaction system of probes for detecting a mutant base sequence to a normal DNA, a faint false positive line appeared in case of 15 mers (Fig. 6, lane 4), but not appeared in cases of 13 mers and 11 mers (Fig. 6, lanes 5 and 6). In the reaction system of probes for detecting a normal base sequence to a mutant DNA, no false positive appeared in any cases of 15 mers, 13 mers and 11 mers (Fig. 6, lanes 7 to 9). Nevertheless, it was found that the

normal positive reactions tended to become decreased in case of 11 mer (Fig. 6, lanes 3 and 12).

[0074]

In consideration of the results of examinations as described above, using the hybridization and competing probes of 12 mers in chain length (Table 3) with the five-fold amount of the competing probe added, the detection was carried out in a similar manner for samples of normal DNA (homozygote of g727 allele), carrier's DNA (heterozygote of g727 allele and t727 allele), and patient's DNA (homozygote of t727 allele). The results are shown in Fig. 7.

[0075]

The results obtained completely corresponds to the genotype with distinct positive reaction lines observed (Fig. 7, lanes 1 and 4). On the contrary, no false positive reaction was found (lanes 2 and 3).

[0076]

[Table 3]

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of normal base sequence
(GSD727-ASO-W12-Bio):

5'-GCTGAACAGGAA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 19)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of normal base sequence
(GSD727-ASO-M12):

5'-GCTGAAAAGGAA-3' (SEQ ID NO: 20)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of mutant base sequence
(GSD727-ASO-M12-Bio):

5'-GCTGAAAAGGAA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 21)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of mutant base sequence
(GSD727-ASO-W12):

5'-GCTGAACAGGAA-3' (SEQ ID NO: 22)

[0077]

[Example 2:]

Detection of Mutation a985g of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency,

Mutation g1691t of GLDC Gene in Hyperglycinemia, Mutation g681a of Drug-Metabolizing Enzyme Gene CYP2C19, and Point Mutation of Glu487Lys of Aldehyde Dehydrogenase 2 Polymorphism

The detection method of the present invention was carried out to detect a point mutation, including mutation a985g of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, mutation g1691t of GLDC gene in hyperglycinemia, mutation g681a of drug-metabolizing enzyme gene CYP2C19, and point mutation of Glu487Lys of aldehyde dehydrogenase 2 polymorphism.

[0078]

The PCR primers for amplifying base sequences containing the respective point mutation sites were adjusted in chain length so as to carry out PCR reactions with setting of an annealing temperature of 55°C. In addition, the hybridization probes were designed to have T_m values in the range of 35 to 40°C. As a result, the chain lengths thereof were 10 mers to 15 mers. The base sequences of primers, hybridization probes, and competing probes are listed in Table 4.

[0079]

[Table 4]

(I) Primers and probes for detection of a985g mutation of gene of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency

PCR forward primer (Dig-MCAD-F1):

5'-Dig-CTTTTAAATTCTAGCACCAAGCAATATC-3' (SEQ ID NO: 23)

PCR reverse primer (Dig-MCAD-R1):

5'-Dig-TCCAAGTATCTGCACAGCAT-3' (SEQ ID NO: 24)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of normal base sequence (Bio-MCAD985-W13):

5'-GCAATGAAAGTTG-Biotin-3' (SEQ ID NO: 25)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of normal base sequence (MCAD985-M13):

5'-GCAATGGAAGTTG-3' (SEQ ID NO: 26)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of mutant base sequence (Bio-MCAD985-M12):

5'-AACTTCCATTGC-Biotin-3' (SEQ ID NO: 27)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of mutant base sequence (MCAD985-W12):

5'-AACTTTCATTGC-3' (SEQ ID NO: 28)

(II) Primers and probes for detection of g1691t mutation of GLDC gene

PCR forward primer (Dig-GLDC-F):

5'-Dig-GTCTCTTGGTCCTACCTAATA-3' (SEQ ID NO: 29)

PCR reverse primer (GLDC-R):

5'-TTAGTGAAGCTAGAACTG-3' (SEQ ID NO: 30)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of normal base sequence (Bio-S564I-W13):

5'-GACCAACTGTTCA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 31)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of normal base sequence (S564I-M13):

5'-GACGAAATGTTCA-3' (SEQ ID NO: 32)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of mutant base sequence (Bio-S564I-M):

5'-GACGAAATGTTCA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 33)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of mutant base sequence (S564I-W):

5'-GACGAACTGTTCA-3' (SEQ ID NO: 34)

(III) Primers and probes for detection of gene polymorphism CYP2C19*2 of CYP2C19 gene

PCR forward primer (CYP2C19-P1):

5'-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3' (SEQ ID NO: 35)

PCR reverse primer (Dig-CYP2C19-P2):

5'-Dig-AATATCACTTTCCATAAAAGCAAG-3' (SEQ ID NO: 36)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of normal base sequence (Bio-CYP2C19-W):

5'-TCCCGGGAAC-Biotin-3' (SEQ ID NO: 37)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of normal base sequence (CYP2C19-M):

5'-TTCCCAGGAAC-3' (SEQ ID NO: 38)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of polymorphic base sequence (Bio-CYP2C19-M):

5'-TTCCCAGGAAC-Biotin-3' (SEQ ID NO: 39)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of polymorphic base sequence (CYP2C19-W):

5'-TCCCGGGAAC-3' (SEQ ID NO: 40)

(IV) Primers and probes for detection of polymorphism of aldehyde dehydrogenase 2 gene

PCR forward primer (Dig-ALDH2-AF):

5'-Dig-CAAATTACAGGGTCAACTGCTATGA-3' (SEQ ID NO: 41)

PCR reverse primer (Dig-ALDH2-AR2):

5'-Dig-AGCAGGTCCTGAACTTCCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 42)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of normal base sequence (Bio-ALDH2-PW2):

5'-Biotin-ATACACTGAAGTGA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 43)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of normal base sequence (ALDH2-CM2):

5'-ATACACTAAAGTGA-3' (SEQ ID NO: 44)

Biotin-labeled oligonucleotide for detection of polymorphic base sequence (Bio-ALDH2-PM2):

5'-Biotin-ATACACTAAAGTGAA-Biotin-3' (SEQ ID NO: 45)

Unlabeled competing oligonucleotide for detection of polymorphic base sequence (ALDH2-CW2):

5'-ATACACTGAAGTGAA-3' (SEQ ID NO: 46)

[0080]

All the PCR conditions or conditions including the concentrations of probes were the same as those of Example 1 in any cases of detecting the mutations described above, except that the above primers and probes must be used.

[0081]

The detections, as carried out under these conditions, showed the correct determination of genotypes in all of the detection systems (Fig. 8, a, b, c, and d). In the detection of Glu487Lys of aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism, the reaction line obtained was weak in the reaction system for detecting a mutant base sequence. However,

when unlabeled competing oligonucleotide was not mixed in this reaction system, the formation of distinct reaction line was observed. In each of the reactions, no false positive was observed.

[0082]

The determination of genotype was completed within 10 minutes after the completion of reaction in the thermal cyclor. Even at least two years after the test strip was dried without any treatment and stored at room temperature, a macroscopic determination thereof was possible.

[0083]

The above-mentioned results show that the detection method of the invention allows of the simple and quick detection of each mutation or polymorphism of the five genes to determine the genotype of sample DNA, even though the design of primers and hybridization probes and competing probes, and the reaction conditions are required to be adjusted slightly for and depending on the respective gene mutations. Therefore, it is concluded that the detection method of the present invention can be used for many purposes.

[0084]

[Effect of the invention]

According to the present invention, the identification of pathogenic gene mutation and the detection of polymorphisms of disease-related genes and drug metabolism enzyme genes can be carried out in a simple, quick and accurate manner without use of other special devices and equipments than a conventional thermal cyclor. The detection method of the present invention allows of the detection at bed side and is thus considered to facilitate the tailor-made medicine.

[0085]

[Sequence listing]

<110> Yoichi Matsubara
Shigeo Kure
Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.

<120> Method of detecting gene mutation

<130> P-B0250

<160> 46

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

cccaaatacct tctatctct cacag

25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

tgctggagtt gagagccagc

20

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 3

aagctgaaca ggaagaa

17

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 4

agctgaacag gaaga

15

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 5

gctgaacagg aag

13

<210> 6

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 6

ctgaacagga a

11

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 7

aagctgaaaa ggaagaa

17

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>		
<223>	probe	
<400>	8	
	agctgaaaag gaaga	15
<210>	9	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	probe	
<400>	9	
	gctgaaaagg aag	13
<210>	10	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	probe	
<400>	10	
	ctgaaaagga a	11
<210>	11	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	probe	
<400>	11	
	aagctgaaaa ggaagaa	17
<210>	12	
<211>	15	

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 12
agctgaaaag gaaga 15

<210> 13
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 13
gctgaaaagg aag 13

<210> 14
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 14
ctgaaaagga a 11

<210> 15
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 15
aagctgaaca ggaagaa 17

<210> 16
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 16
 agctgaacag gaaga 15

<210> 17
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 17
 gctgaacagg aag 13

<210> 18
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 18
 ctgaacagga a 11

<210> 19
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 19	
gctgaacagg aa	12
<210> 20	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 20	
gctgaaaagg aa	12
<210> 21	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 21	
gctgaaaagg aa	12
<210> 22	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 22	
gctgaacagg aa	12
<210> 23	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> primer

<400> 23

ctttttaatt ctagcaccaa gcaatatc

28

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 24

tccaagtatc tgcacagcat

20

<210> 25

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 25

gcaatgaaag ttg

13

<210> 26

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 26

gcaatggaag ttg

13

<210> 27

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>		
<223>	probe	
<400>	27	
aacttcatt	gc	12
<210>	28	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	probe	
<400>	28	
aactttcatt	gc	12
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	29	
gtctcttggt	cctaccta a	21
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	30	
ttagtgaagc	tagaactg	20
<210>	31	
<211>	13	

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 31
gacgaactgt tca 13

<210> 32
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 32
gacgaaatgt tca 13

<210> 33
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 33
gacgaaattg tca 13

<210> 34
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 34
gacgaactgt tca 13

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 35
aattacaacc agagcttggc

20

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 36
aatatcactt tccataaaag caag

24

<210> 37
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 37
tcccgggaac

10

<210> 38
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 38

ttcccaggaa c 11

<210> 39

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 39

ttcccaggaa c 11

<210> 40

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 40

tcccgggaac 10

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 41

caaattacag ggtcaactgc tatga 25

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 42	
agcaggtcct gaacttcag cag	23
<210> 43	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 43	
atacactgaa gtga	14
<210> 44	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 44	
atacactaaa gtga	14
<210> 45	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 45	
atacactaaa gtgaa	15
<210> 46	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>

<223> probe

<400> 46

atacactgaa gtgaa

[Brief description of the drawings]

[Fig. 1] Fig. 1 shows the principle of the detection method according to the present invention (when normal DNA is used as a sample).

[Fig. 2] Fig. 2 shows the principle of the detection method according to the present invention (when mutant DNA is used as a sample).

[Fig. 3] Fig. 3 shows an example of procedures used in the detection method according to the present invention.

[Fig. 4] Fig. 4 shows the result of detection (chromatogram images) in the case of using a 17-mer hybridization probe.

[Fig. 5] Fig. 5 shows the result of detection (chromatogram images) in the case of using a 17-mer hybridization probe and adding a competing probe.

[Fig. 6] Fig. 6 shows the result of detection (chromatogram images) in the case of using hybridization probes of various lengths and adding a competing probe.

[Fig. 7] Fig. 7 shows the result of detection (chromatogram images) in the case of using a 12-mer hybridization probe and adding a competing probe.

[Fig. 8] Fig. 8 shows the result of the detection (chromatogram images) of a variety of mutations.

FIG 1

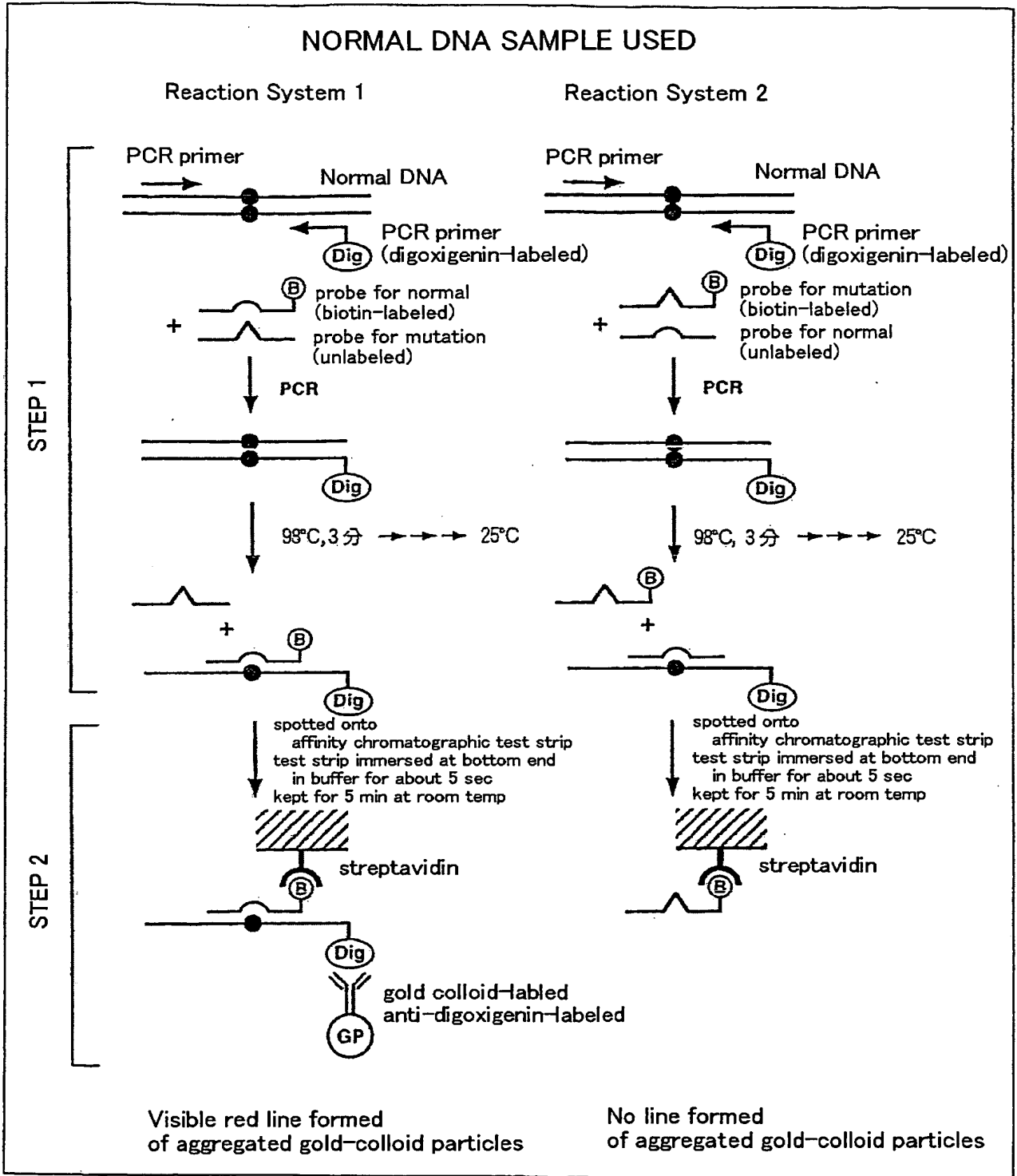


FIG 2

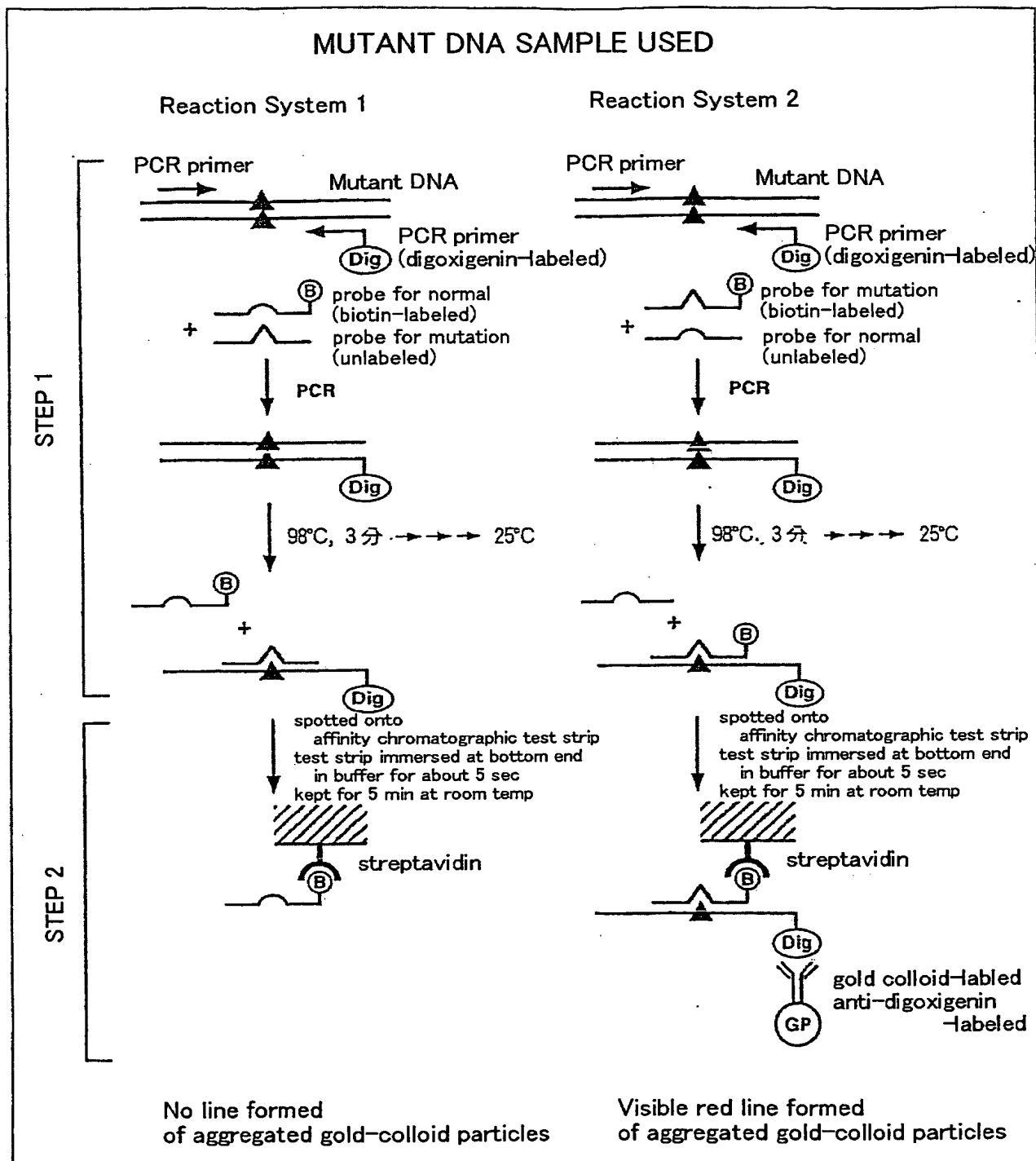


FIG 3

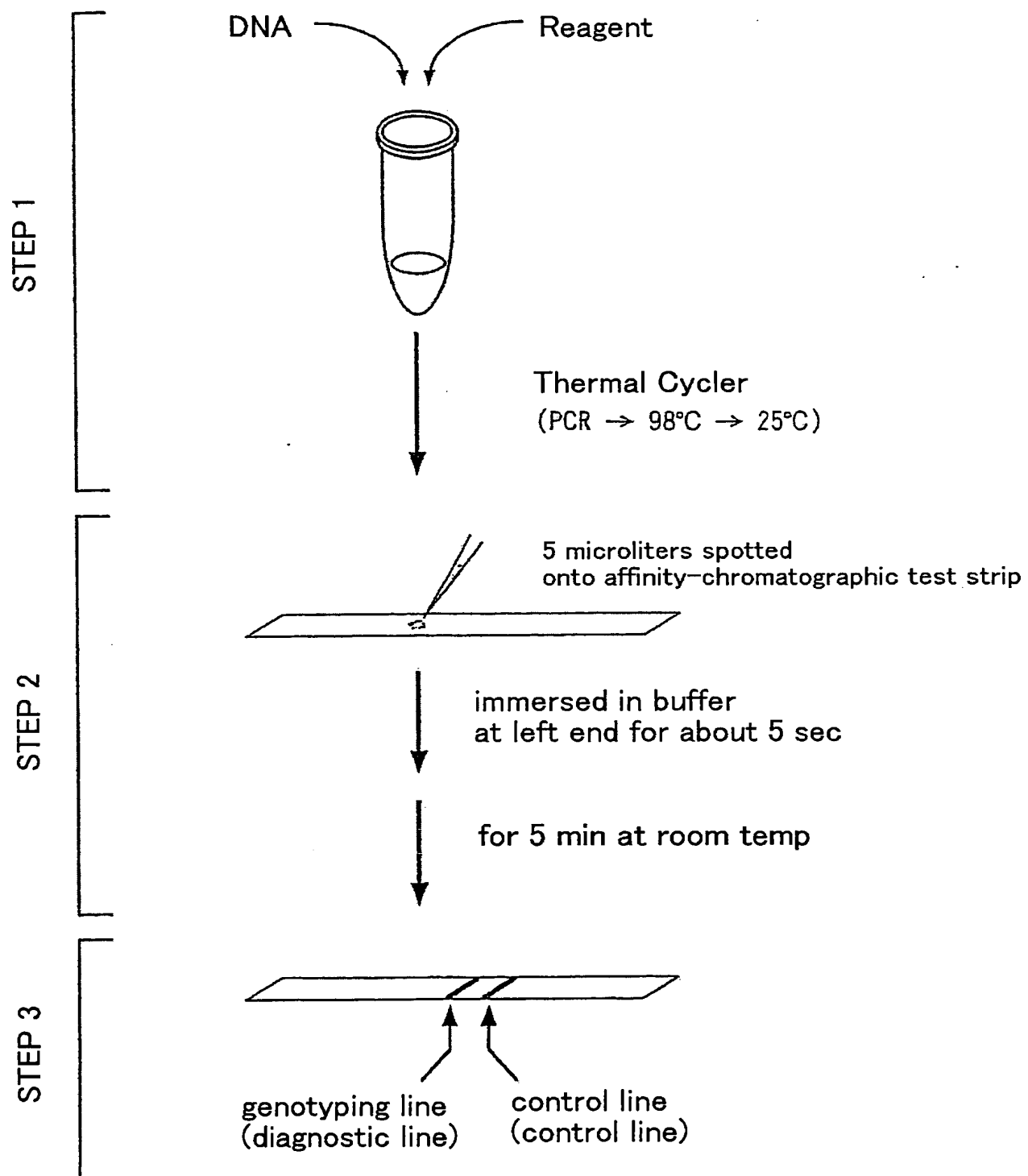


FIG 4

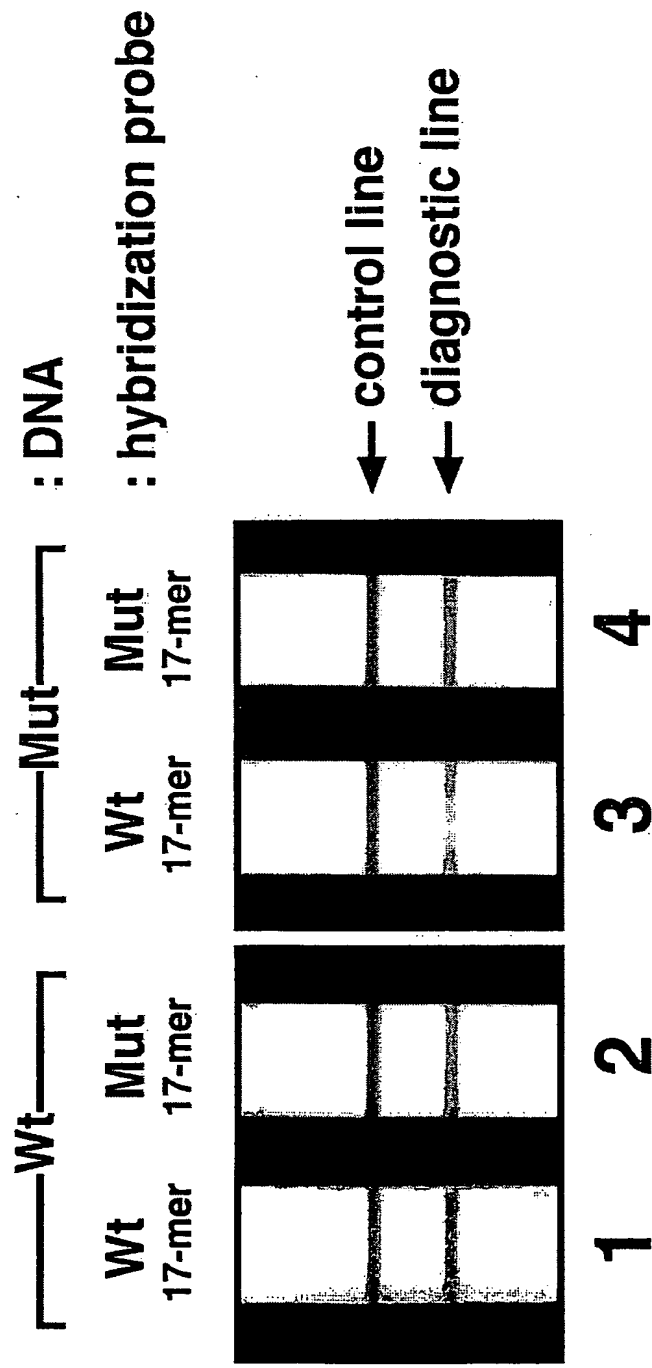
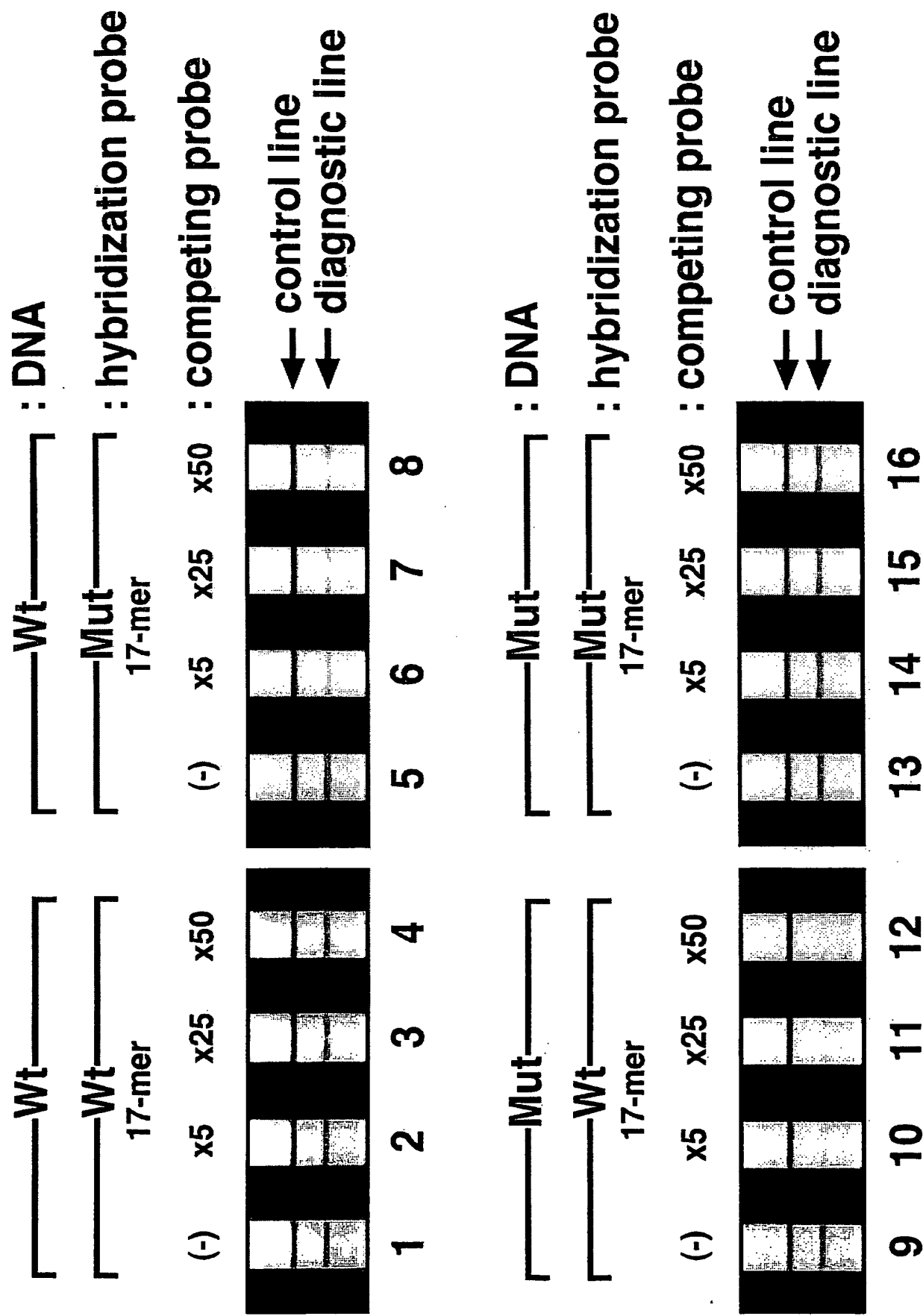


FIG 3



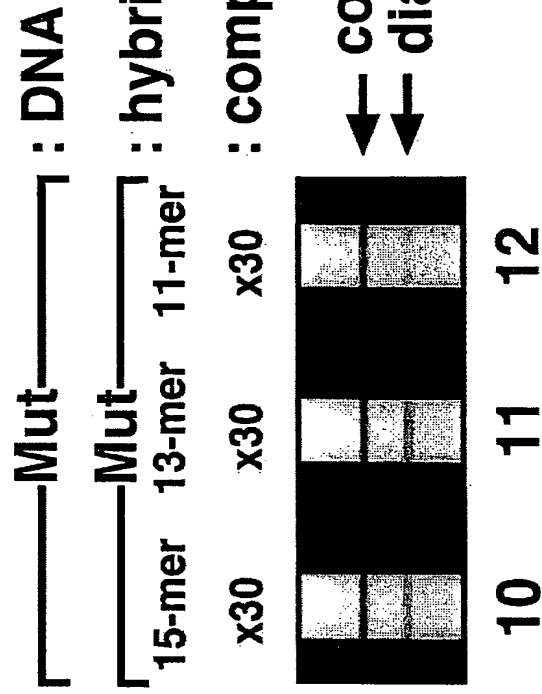
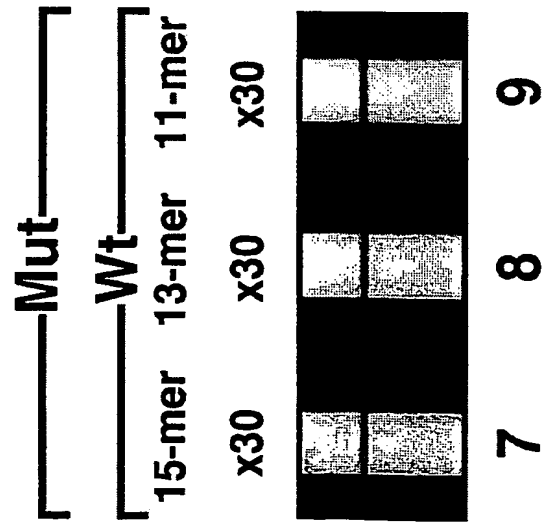
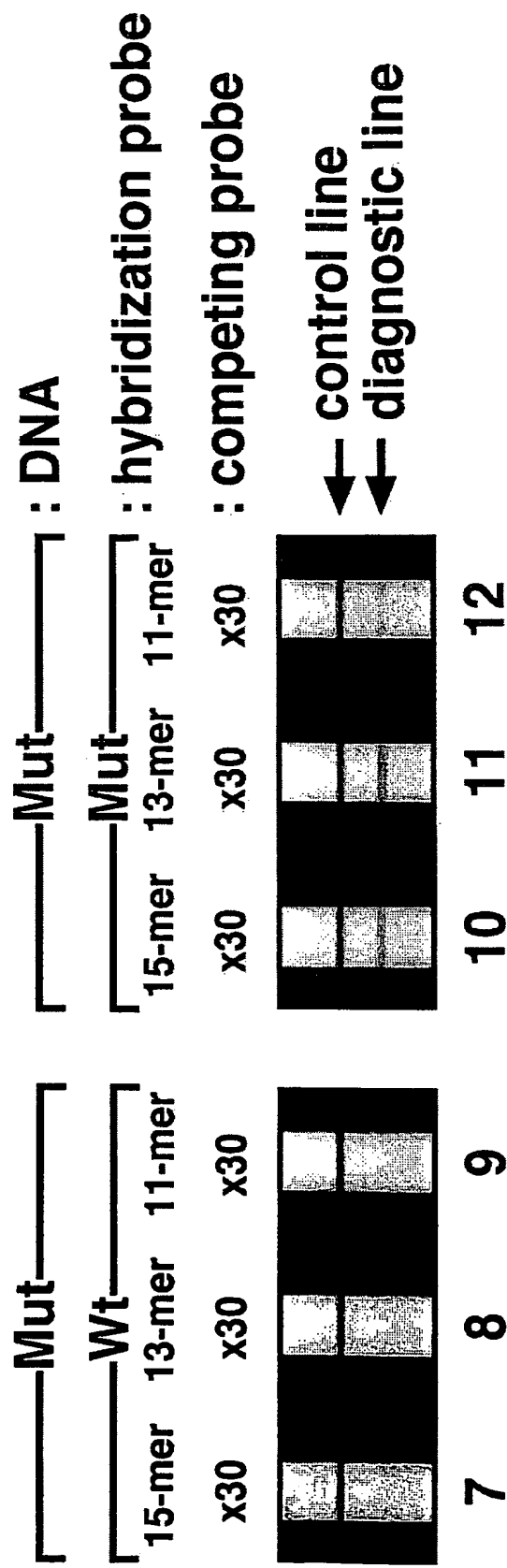
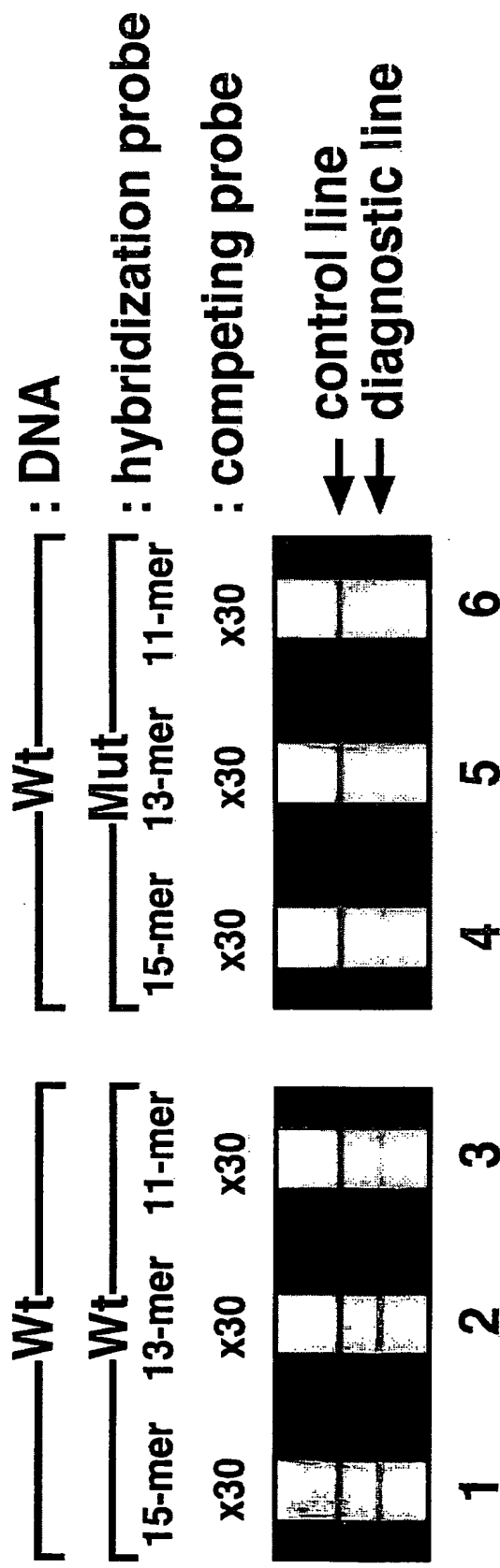
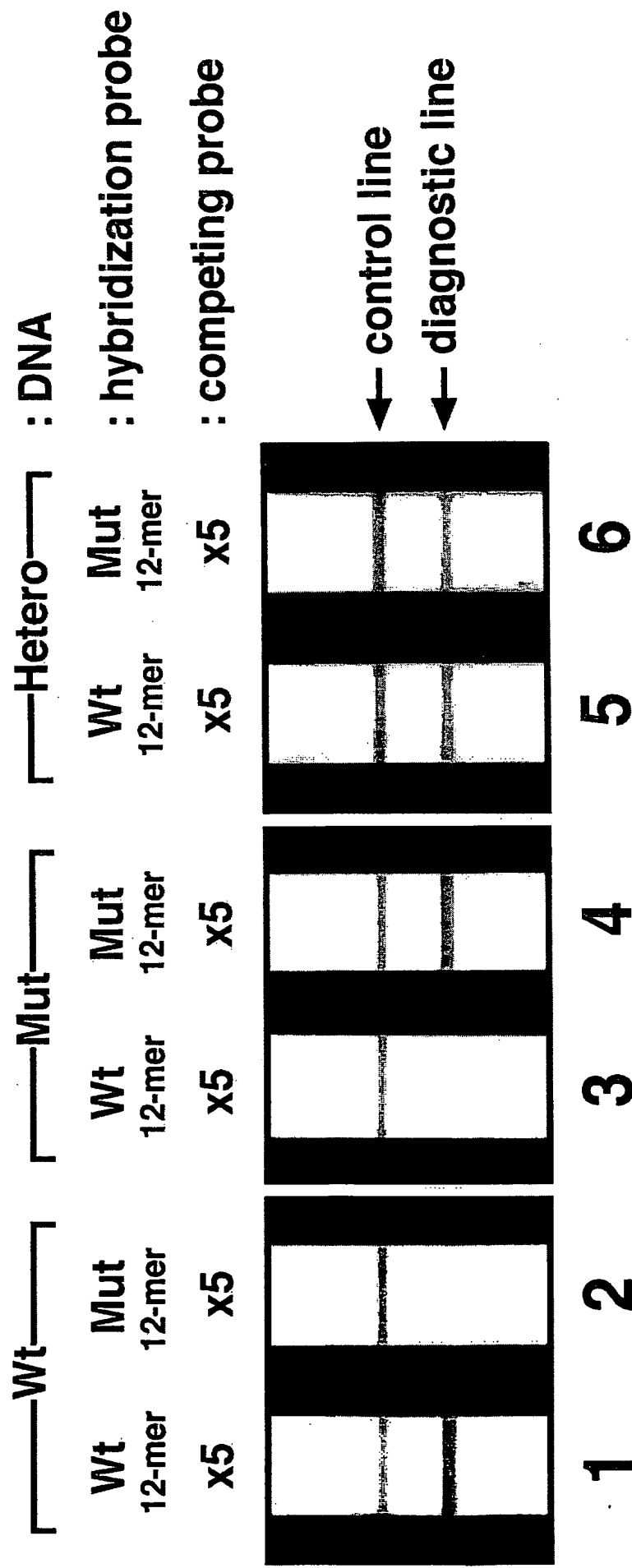
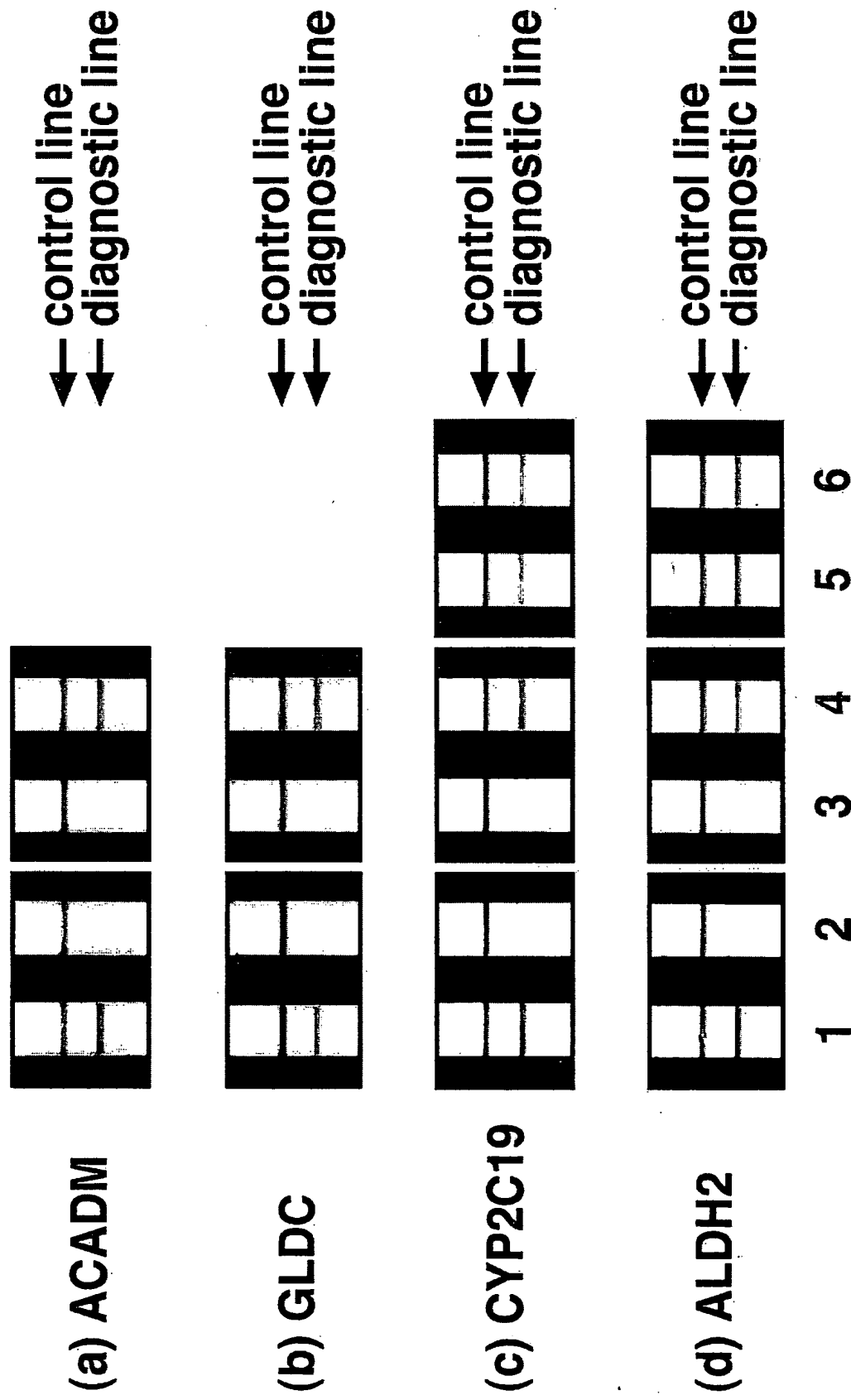


FIG 7





[Name of document] Abstract

[Abstract]

[Problem] Providing a simple and quick detection method of gene mutation.

[Means to solve the problem] DNA amplification and hybridization are successively carried out in a reaction system containing primers for the DNA amplification and hybridization probes, followed by detecting the hybrid in the reaction solution by affinity chromatography, wherein at least one of the primers to be used in the DNA amplification is labeled with a first labeling agent so that the amplified DNA will be labeled with the first labeling agent, a hybridization probe is labeled with a second labeling agent and contained in a reaction solution for effecting the DNA amplification, the base sequence of the hybridization probe is designed not to inhibit the DNA amplification, and a hybrid is detected by affinity chromatography with the use of the first and second labeling agents.

[Selected drawing] Fig. 1

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.11.03

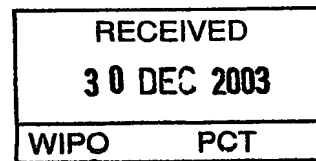
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月 7日

出願番号
Application Number: 特願2002-323419
[ST. 10/C]: [JP2002-323419]

出願人
Applicant(s): 松原 洋一
呉 繁夫
株式会社三菱化学ビーシーエル

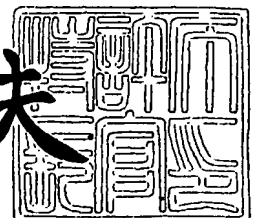


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3102500

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0250

【提出日】 平成14年11月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
G01N 33/53

【発明の名称】 遺伝子変異検出法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区恵和町 13-10

【氏名】 松原 洋一

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区葉山町 3-20-312

【氏名】 呉 繁夫

【特許出願人】

【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区恵和町 13-10

【氏名又は名称】 松原 洋一

【特許出願人】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区葉山町 3-20-312

【氏名又は名称】 呉 繁夫

【特許出願人】

【識別番号】 591122956

【氏名又は名称】 株式会社三菱化学ビーシーエル

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子変異検出法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 DNAポリメラーゼを用いて、変異部位を含む検出対象塩基配列を含むDNAの増幅を行う工程、増幅されたDNAと、検出対象塩基配列に相補的である塩基配列を有するハイブリダイゼーションプローブとをハイブリダイズさせる工程、および、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを検出する工程を含む塩基配列の検出方法であって、

DNAの増幅に用いるプライマーの少なくとも一つは、増幅されたDNAが第1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識されており、ハイブリダイゼーションプローブは第2の標識物質により標識されるとともに、DNAの増幅が行われる反応液に含まれており、ハイブリダイゼーションプローブの有する塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定されており、ハイブリッドの検出は第1の標識物質および第2の標識物質を利用してアフィニティークロマトグラフィーにより行われる前記方法。

【請求項2】 変異部位が点変異であり、DNAの増幅が行われる反応液が、増幅されたDNAと標識されたハイブリダイゼーションプローブとのハイブリダイゼーションの特異性を高めるのに十分な量の、標識されたハイブリダイゼーションプローブの塩基配列と点変異の位置で1塩基異なる塩基配列を有しかつ標識されていないオリゴヌクレオチドをさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項3】 DNAの増幅がPCRによる増幅である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 DNAポリメラーゼを用いて、変異部位を含む検出対象塩基配列を含むDNAの増幅を行うためのプライマーと、検出対象塩基配列に相補的である塩基配列を有するハイブリダイゼーションプローブと、アフィニティークロマトグラフィー用試験片とを含むキットであって、

DNAの増幅に用いるプライマーの少なくとも一つは、増幅されたDNAが第1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識されており、ハイブリダイゼーションプローブは第2の標識物質により標識され、ハイブリダイ

ゼーションプローブの有する塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定されており、試験片は第1の標識物質および第2の標識物質を利用して増幅されたDNAとハイブリダイゼーションプローブとのハイブリッドを検出できるものである前記キット。

【請求項5】 変異部位が点変異であり、標識されたハイブリダイゼーションプローブの塩基配列と点変異の位置で1塩基異なる塩基配列を有しかつ標識されていないオリゴヌクレオチドをさらに含む請求項4記載のキット。

【請求項6】 プライマーがPCR用プライマーである請求項4または5記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、塩基配列の検出方法に関し、より詳しくは、点変異などの変異部位を含む塩基配列を含む塩基配列を検出することにより遺伝子の変異を検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ゲノム上に数多く存在する遺伝子多型は、疾病への感受性や、薬剤代謝の個人差などに深く関連していると考えられている。これらの遺伝子多型の検出は、いわゆるオーダーメイド医療にとって必須であり、ゲノム科学の臨床応用における最重要研究課題のひとつに挙げられている。なかでも、遺伝子多型マーカーとしてSNP (single nucleotide polymorphism、一塩基置換による遺伝子多型) は最近とみに注目を浴びており、国際的にも巨額の研究費が投じられている。また一方、分子遺伝学研究の進歩によって、様々な遺伝性疾患における遺伝子変異がデータベースに蓄積されてきている。これを用い、すでに病因であることが明らかにされている既知の遺伝子変異をスクリーニングすることによって、遺伝病の診断や臨床病型の予測をおこなうことが可能となってきた。特に、特定集団内、あるいは人種を超えて高頻度に存在する遺伝子変異の場合、その診断的価値は高い。

【0003】

以上のような遺伝子多型や遺伝子変異には、塩基置換、欠失、挿入、繰り返し配列数の相違などがあるが、その中で圧倒的に多数を占めているのが、一塩基置換による点変異である。ヒトゲノム研究の成果を臨床の場に還元していくためには、この点変異の簡便かつ迅速な検出法が不可欠である。

【0004】

これまで点変異の検出法として、様々な手法が考案されてきた（非特許文献1参照）。代表的な方法としては、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション（allele specific oligonucleotide hybridization、ASO）法、対立遺伝子特異的増幅法、制限酵素消化法、リガーゼ連鎖反応、ミニシーケンス法などが挙げられる。これらの手法はいずれも、DNA増幅後に、ハイブリダイゼーションや電気泳動をはじめとする煩雑な操作が必要とされる。一方、近年ヒトゲノム解析研究に対応するために開発された、TaqMan法、インベダーアッセイ（invader assay）、DNAマイクロアレイ（DNAチップ）、質量分析計を用いるTOF-MASS法などは、大量検体の処理に秀でているものの、高額の特種専用機器を必要とし、臨床検査室レベルで簡単に施行できるものではない。また、遺伝子変異のスクリーニング法として広く用いられているSSCP法、ケミカルクリーブジ（chemical cleavage）法およびDHPLC法は未知の遺伝子変異の大まかなスクリーニングに威力を発揮するが、既知変異の確実な検出には不適切である。さらに、シーケンス法を用いた点変異検出は、操作が複雑でコストも高く、既知変異の検出にはオーバースペックといわざるを得ない。上記のいずれの方法も、現段階では遺伝子解析実験室でおこなわれる特種検査であり、臨床の現場（ベッドサイド）で迅速に実施することはきわめて困難である。

【0005】

ASO法に使用されるプローブとしては、従来は15～25merが用いられている（非特許文献2参照）。また、ハイブリダイゼーションにおいて、標識プローブに競合するオリゴヌクレオチドを用いてプローブの特異性を増強させることが報告されている（非特許文献3参照）。

【0006】

【非特許文献 1】

Cotton RGH. Mutation Detection. pp.1-198, Oxford University Prese, Oxf
ord, 1997

【非特許文献 2】

Saiki RK, Erlich HA. Dection of mutations by hybridization with sequen
ce-specific oligonucleotide probes. In: Mutation Detection: A Practical
Approach. pp.113-129, IRL Press, Oxford, 1998

【非特許文献 3】

Nozari G, Rahbar S, Wallace RB. Discrimination among the transcripts o
f the alleic human β -globin genes β^A , β^S and β^C using oligodeoxynucl
eotide hybridization probes. Gene 43:23-28, 1986

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、遺伝子の変異の簡便かつ迅速な検出法を提供することを目的とする
。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、特定のプライマーおよびプローブを特定の条件で用いると、一
つの反応系で核酸の増幅とハイブリダイゼーションを行うことができ、しかもハ
イブリダイゼーションにより形成したハイブリッドを容易に検出できるという知
見を得、この知見に基づき、本発明を完成するに至った。

本発明は、以下のものを提供する。

【0009】

(1) DNAポリメラーゼを用いて、変異部位を含む検出対象塩基配列を含む
DNAの増幅を行う工程、増幅されたDNAと、検出対象塩基配列に相補的であ
る塩基配列を有するハイブリダイゼーションプローブとをハイブリダイズさせる
工程、および、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを検出す
る工程を含む塩基配列の検出方法であって、

DNAの増幅に用いるプライマーの少なくとも一つは、増幅されたDNAが第

1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識されており、ハイブリダイゼーションプローブは第2の標識物質により標識されるとともに、DNAの増幅が行われる反応液に含まれており、ハイブリダイゼーションプローブの有する塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定されており、ハイブリッドの検出は第1の標識物質および第2の標識物質を利用してアフィニティークロマトグラフィーにより行われる前記方法。

【0010】

(2) 変異部位が点変異であり、DNAの増幅が行われる反応液が、増幅されたDNAと標識されたハイブリダイゼーションプローブとのハイブリダイゼーションの特異性を高めるのに十分な量の、標識されたハイブリダイゼーションプローブの塩基配列と点変異の位置で1塩基異なる塩基配列を有しかつ標識されていないオリゴヌクレオチドをさらに含む(1)の方法。

【0011】

(3) DNAの増幅がPCRによる増幅である(1)または(2)の方法。

【0012】

(4) DNAポリメラーゼを用いて、変異部位を含む検出対象塩基配列を含むDNAの増幅を行うためのプライマーと、検出対象塩基配列に相補的である塩基配列を有するハイブリダイゼーションプローブと、アフィニティークロマトグラフィー用試験片とを含むキットであって、

DNAの増幅に用いるプライマーの少なくとも一つは、増幅されたDNAが第1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識されており、ハイブリダイゼーションプローブは第2の標識物質により標識され、ハイブリダイゼーションプローブの有する塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定されており、試験片は第1の標識物質および第2の標識物質を利用して増幅されたDNAとハイブリダイゼーションプローブとのハイブリッドを検出できるものである前記キット。

【0013】

(5) 変異部位が点変異であり、標識されたハイブリダイゼーションプローブの塩基配列と点変異の位置で1塩基異なる塩基配列を有しかつ標識されていない

オリゴヌクレオチドをさらに含む（４）のキット。

【0014】

（６）プライマーがPCR用プライマーである（４）または（５）のキット。

【0015】

【発明の実施の形態】

<1>本発明の検出法

本発明の検出法は、DNAポリメラーゼを用いて、変異部位を含む検出対象塩基配列を含むDNAの増幅を行う工程、増幅されたDNAと、検出対象塩基配列に相補的である塩基配列を有するハイブリダイゼーションプローブとをハイブリダイズさせる工程、および、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを検出する工程を含む塩基配列の検出方法であって、

DNAの増幅に用いるプライマーの少なくとも一つは、増幅されたDNAが第1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識されており、ハイブリダイゼーションプローブは第2の標識物質により標識されるとともに、DNAの増幅が行われる反応液に含まれており、ハイブリダイゼーションプローブの有する塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定されており、ハイブリッドの検出は第1の標識物質および第2の標識物質を利用してアフィニティークロマトグラフィーにより行われることを特徴とする。以下、各工程毎に説明する。

【0016】

（１）DNAの増幅

DNAの増幅は、DNAポリメラーゼを用いて行われるものであれば、特に制限されず、DNAポリメラーゼを用いてDNAを合成する段階を含む増幅方法を用いることができる。DNAの増幅の方法の例としては、PCR法、TMA法、NASBA法、LAMP法などが挙げられる。

【0017】

DNAポリメラーゼによりDNAを合成する場合には、プライマーが必要となる。プライマーは、増幅の方法および検出対象塩基配列に依存して公知の方法により設定される。本発明においては、DNAの増幅に用いるプライマーの少なく

とも一つは、増幅されたDNAが第1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識される。

【0018】

例えば、増幅がPCR法により行われる場合、プライマー対が用いられるが、少なくともその一方を標識することにより、増幅されたDNAが標識されたものとなる。また、NASBA法およびTMA法により行われる場合には、DNA合成段階に働くプライマーを、LAMP法の場合には、片方のインナープライマーを少なくとも標識することにより増幅されたDNAが標識されたものとなる。

【0019】

プライマーの標識は、DNAの合成反応を阻害しないように行われる。このような標識は公知の方法に従って行うことができ、通常にはプライマーの5'末端が標識される。

【0020】

標識に用いられる標識物質は、それに対して生体特異的に結合する物質が存在するものであればよい。このような標識物質と、それに対して生体特異的に結合する物質の組み合わせとしては、抗原と抗体、酵素と阻害剤、糖鎖とレクチン、ホルモンと受容体、金属結合蛋白質と金属元素が挙げられる。具体的には、ジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン抗体、ビオチンとストレプトアビジンなどの組み合わせが挙げられる。これらの組み合わせにおいて、いずれが標識物質となってもよいが、通常には、分子量の小さい方が、標識物質として用いられる。

【0021】

用いられるプライマーやDNAの増幅の条件は、採用する増幅方法および検出対象配列に基づいて適したものが設定される。例えば、PCR法については、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.), Volume 2, Chapter 8, pp. 8.1-8.126, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001、NASBA法については、PCR Methods and Applications, 1, 25-33 (1991)、LAMP法については、Nucleic Acids Research, Vol. 28, No. 12, pp. i-vii (2000)をそれぞれ参照できる。

【0022】

増幅において、鋳型となる検体DNAは、検査試料から通常の方法により調製できる。

【0023】

検出対象配列は、変異部位を含む検出対象配列が特異的に増幅されるように、増幅の方法に合わせて適宜選択される。検出対象配列が含む変異部位は、通常には、遺伝子変異および遺伝子多型として知られている部位である。変異部位は、点変異でもよいし、その他欠失などの変異でもよい。

【0024】

本発明の検出法の検出対象となる遺伝子変異および遺伝子多型の例としては、糖原病Ia型の日本人患者で高頻度に認められるg727t変異、中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症の白人患者で高頻度に認められるa985g変異（Lys329Glu変異）、高グリシン血症のフィンランド人患者で高頻度に認められるGLDC遺伝子のg1691t変異（Ser564Ile変異）、薬剤代謝酵素遺伝子CYP2C19における遺伝子多型（CYP2C19*2, g681a）、アルコール代謝の個人差を決定するアルデヒド脱水素酵素2の遺伝子多型（E487K）が挙げられる。

【0025】

糖原病Ia型はグリコーゲン代謝経路におけるグルコース-6-ホスファターゼの異常によって生じ、主として肝臓に大量のグリコーゲンが蓄積する先天性糖代謝異常症で、常染色体劣性遺伝形式をとる。低血糖、肝腫大、低身長、腎障害、高脂質血症、高尿酸血症などが見られる。この酵素遺伝子におけるg727t変異は、日本人症例における病因変異の約90%を占める高頻度変異であり、mRNAのスプライシング異常を生じる。ごく最近まで、本症診断には、肝臓組織を用いた酵素活性測定が行われていたが、遺伝子診断の出現によって肝生検が不要となった。本変異の日本人集団における保因者数は、約200人に1人である。

【0026】

非ケトーシス型高グリシン血症はグリシン解裂系酵素の異常によって生じ、新生児期にけいれんをはじめとする重篤な神経症状を呈する先天性アミノ酸代謝異常症（常染色体劣性遺伝）である。フィンランド人患者では、グリシン解裂系酵素のうちGLDC遺伝子にg1691t変異が高頻度（変異遺伝子の約70%）に認められる

。本変異はアミノ酸置換Ser564Ileを生じる。

【0 0 2 7】

中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症は脂肪酸 β 酸化経路において重要な役割を担う酵素 (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD) の異常によって生じ、空腹・感染時の低血糖・意識障害をひきおこす先天性有機酸代謝異常症 (常染色体劣性遺伝) である。しばしば、乳幼児突然死症候群や急性脳症 (ライ症候群) と誤診されることが知られている。本酵素遺伝子におけるa985g変異は白人症例における病因変異の約90%を占める高頻度変異であり、アミノ酸置換Lys329Gluをひきおこす。また、本遺伝子変異の保因者は、白人集団で高率 (英国では40人に1人) に認められる。欧米では、このa985g変異を検出する遺伝子診断が本症の診断に広く用いられている。

【0 0 2 8】

CYP2C19遺伝子は、オメプラゾール (胃酸分泌抑制剤) などの代謝に重要な役割を果たしている。本遺伝子上のSNP多型であるCYP2C19*2は、エキソン5の681G>A変異によってスプライシング異常を生じるため、これらの薬剤の代謝活性を低下させる。このような多型を持つ人 (poor metabolizer) では、投薬にあたって減量する必要がある、投薬前に予め遺伝子型を決定できれば、臨床的に有利である。日本人集団における遺伝子の約23%に、この遺伝子多型が認められる。

【0 0 2 9】

アルデヒド脱水素酵素2の遺伝子多型 (Glu487Lys) は、東洋人に多く認められるSNPで、アルコール代謝の個人差を決定する。遺伝子多型を有する酵素は活性が低く、アルコールから生じるアセトアルデヒドの代謝が遅くなるため、「酒に弱い」体質となる。日本人集団では約30%がこの遺伝子多型のヘテロ接合子、約5%がホモ接合子である。

【0 0 3 0】

(2) ハイブリダイゼーション

増幅されたDNAと、検出対象塩基配列に相補的である塩基配列を有するハイブリダイゼーションプローブとのハイブリダイゼーションは、特定のハイブリダイゼーションプローブが使用される他は、通常のハイブリダイゼーションと同様

に行えばよい。

【0031】

本発明で使用するハイブリダイゼーションプローブは、第2の標識物質により標識され、DNAの増幅が行われる反応液に含まれており、ハイブリダイゼーションプローブの有する塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定される。

【0032】

第2の標識物質は、第1の標識物質と異なる物質が用いられる他は、第1の標識物質について説明したのと同様である。ハイブリダイゼーションプローブの標識は、ハイブリダイゼーションを妨げないように公知の方法により行うことができる。ハイブリダイゼーションプローブの標識は、3'末端に行うことが好ましい。これによりDNAの増幅反応中のオリゴヌクレオチドの鎖長の進展を防止するためである。鎖長の進展があった場合は T_m 値が上昇し、たとえミスマッチがあってもハイブリダイズしてしまうおそれがある。

【0033】

ハイブリダイゼーションプローブの塩基配列を、DNAの増幅を阻害しないように設定することは、通常には、ハイブリダイゼーションプローブのハイブリダイゼーションがDNAの増幅の条件では生じないようにハイブリダイゼーションプローブの鎖長などを設定することにより行うことができる。

【0034】

本発明で使用するハイブリダイゼーションプローブの塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定されるので、DNAの増幅が行われる反応液に最初から含ませておくことができる。このため、DNAの増幅が終了した反応液を、そのまま、増幅されたDNAとハイブリダイゼーションプローブとがハイブリダイズするような条件におくことにより、これらをハイブリダイズさせることができる。

【0035】

ハイブリダイゼーションプローブの鎖長や、ハイブリダイズさせるときの条件は、DNAの増幅に用いる方法に応じて適宜設定される。DNAポリメラーゼを

用いるDNAの増幅では、DNAポリメラーゼの活性が発揮されるのに適した温度条件で増幅が行われるので、この温度でハイブリダイゼーションが生じないように鎖長が設定される。また、ハイブリダイゼーションが起こる温度は、DNAの増幅を妨げない限り、特に限定されないが、生成したハイブリッドが室温で解離しないものであることが好ましい。

【0036】

DNAの増幅を阻害しないように塩基配列を設定する条件として具体的には、プライマーの T_m 値に比べて、プローブの T_m 値が25～40℃（好ましくは30～35℃）低くなるように設定することが挙げられる。

【0037】

例えば、PCR法の通常の条件を考慮すると、プローブは、通常には、10mer～13merとなる。これは、アレル特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのプローブとして、従来用いられている15mer～25mer（上記非特許文献2参照）に比較してかなり短いものである。これまで、より長い鎖長のプローブが多用されてきた背景には、全ゲノム配列（30億塩基対）の中で、4種塩基の組み合わせによる特異性を持ったプローブを作成するためには、少なくとも4の15乗くらいが必要であるという論理があった。しかしながら、これは全ゲノム配列を対象にハイブリダイゼーションを行う場合であり、PCR増幅された数百塩基のDNA断片を標的とする場合は、これほどの長さと特異性は要求されないと考えられるので、ハイブリダイゼーションの特異性は十分に維持される。

【0038】

本発明の検出法を、任意の遺伝子変異や多型の検出に応用するにあたっては、ハイブリダイゼーションプローブを最適の鎖長にすることが必要である。これは、後述の実施例に記載されているように定型的な実験により決定することが可能である。本発明の検出法では、通常、極めて短いプローブを用いることから、1塩基長の差によって劇的な判定線形成の違いが認められる。偽陽性の出現や微弱な陽性反応が認められた場合には、 T_m 値をもとに設計したプローブよりも短いプローブあるいは長いプローブを作成し、最適のものを選択することが好ましい。この際、正常塩基配列プローブと変異塩基配列プローブでは、同じ鎖長でも塩基

置換によって T_m 値が異なるため、それぞれに最適な鎖長を独立して設定すべきである。

【0039】

ハイブリダイゼーションプローブの塩基配列は、変異部位がその中央付近となるように設定することが好ましい。

【0040】

ハイブリダイゼーションは、通常には、温度を二本鎖DNAが変性するまで上昇させ、徐々に低下させることによって行なわれる。従って、DNAの増幅が終わった反応液の温度を変化させる操作のみでハイブリダイゼーションを行うことができ、その他の操作が不要である。プログラム可能なサーマルサイクラーによりDNAの増幅を行う場合には、DNAの増幅に必要な温度条件に加えて、ハイブリダイゼーションの温度条件もプログラムしておくことにより、試料をサーマルサイクラーにセットした後は、一連の反応として、増幅およびハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0041】

上述のように設定された短いプローブを使用することによって、以下の3つの利点が生じる。1) 一塩基のミスマッチがある場合とない場合の T_m 値の差を、長いプローブに比べて大きくすることができ、プローブの特異性を比較的に増加させることができる。2) プローブのハイブリダイゼーション温度は、従来、37～65℃であるが、本発明の検出方法では、25℃と低く設定できるため、その後の一連の操作を室温で行うことができる。3) 短いプローブは T_m 値が低く、PCR反応中はハイブリダイゼーションしないため、PCR反応液中にあらかじめ混和しておいてもPCR反応に影響を及ぼさない。これによって、PCR→熱変性→ハイブリダイゼーションを、途中で、試薬の添加などの操作を新たに加えることなく、一連の反応として行うことができる。これらの利点は、PCR法と同様にDNAポリメラーゼの伸長反応を利用する他のDNA増幅法においても同様に得られる。

【0042】

(3) ハイブリッド検出

ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドは、第1の標識物質お

よび第2の標識物質の両方を有している。ハイブリッドの検出は第1の標識物質および第2の標識物質を利用してアフィニティークロマトグラフィーにより行われる。

【0043】

アフィニティークロマトグラフィーは、そのために構成された試験片により行うことができる。2種の標識物質を利用してアフィニティークロマトグラフィーによりハイブリッドを検出することは公知の方法に従って行うことができ、この

【0044】

このような試験片の例としては、集積したときに可視的な標識物質（例えば金コロイド）を結合した、第1の標識物質に対して特異的に結合する物質と、ハイブリッドとを反応させ、第2の標識物質に対して特異的に結合する物質を固定したクロマト担体上を移動させ、その固定部位に集積した可視的な標識物質を観察できるように構成された試験片が挙げられる。このような試験片自体は、これまでも特定遺伝子を簡便に検出する方法などに用いられている（J. Clin. Microbiol. 38: 2525-2529, 2000）。

【0045】

以下、第1の標識物質がジゴキシゲニン、第2の標識物質がビオチン、集積したときに可視的な標識物質が金コロイドである場合を例にとって具体的な例を説明する。クロマト担体のストリップに、クロマト溶媒に浸漬されることによりクロマト溶媒を供給する浸漬部位、クロマト溶媒中に、金コロイドを結合した抗ジゴキシゲニン抗体を遊離し得るようにこの抗体（複合体）を保持するパッドを付与した複合体保持部位、ハイブリッドを含む反応液を適用する試料適用部位、ストレプトアビジンをクロマト溶媒の移動方向に対して垂直に線状に固定したストレプトアビジン固定部位、抗ジゴキシゲニン抗体に対する抗体を固定した抗体固定部位、および、クロマト溶媒を吸収するパッドを付与した吸収部位が、クロマト溶媒（通常には緩衝液）の移動方向においてこの順に設けられる。この例の試験片の使用方法について説明する。ハイブリッドを含む反応液を試料適用部位に適用し、浸漬部位をクロマト溶媒に浸漬した後、クロマト溶媒から試験片を取り上げ静置する。クロマト溶媒は、クロマト担体を毛細管現象により移動し、複合

体保持部位に達すると複合体を含むクロマト溶媒が移動する。このクロマト溶媒が試料適用部位に達すると適用された反応液中のハイブリッドの有するジゴキシゲニンと複合体の抗ジゴキシゲニン抗体が結合し、金コロイドを有するハイブリッドが形成され、クロマト媒体によりさらにクロマト担体上を移動する。ハイブリッドがストレプトアビジン固定部位に達すると、ビオチンとストレプトアビジンとの結合により、このハイブリッドがストレプトアビジン固定部位に集積されるので、ハイブリッドが存在すれば、可視的な信号が現れる。ストレプトアビジン固定部位を通過した複合体は、抗体固定部位に集積され、クロマトグラムが正常に進んだことを示す可視的な信号が現れる。さらに移動したクロマト溶媒は、吸収部位に吸収・保持される。

【0046】

本発明の検出法において、変異部位が点変異である場合には、ハイブリダイゼーションプローブと共に、増幅されたDNAと標識されたハイブリダイゼーションプローブとのハイブリダイゼーションの特異性を高めるのに十分な量の、標識されたハイブリダイゼーションプローブの塩基配列と点変異の位置で1塩基異なる塩基配列を有しかつ標識されていないオリゴヌクレオチド（以下、「競合プローブ」ともいう）をさらにDNAの増幅を行う反応液に含ませることが好ましい。

【0047】

競合プローブは、ハイブリダイゼーションプローブと点変異の位置で1塩基異なる他は、ハイブリダイゼーションプローブと同様に設定される。競合プローブはハイブリダイゼーションプローブと長さが異なってもよい。

【0048】

増幅されたDNAと標識されたハイブリダイゼーションプローブとのハイブリダイゼーションの特異性を高めるのに十分な量は、検出対象塩基配列、ハイブリダイゼーションプローブの塩基配列などの条件により変化するが、通常には、ハイブリダイゼーションプローブの等量～5倍量（モル比）を基本としてよいと思われる。しかしながら、陽性反応を著しく減ずるときは、偽陽性反応が出現しないことを確認したうえで競合プローブを省略する方が最適の結果が得られる場合

がある。ハイブリダイゼーションプローブの鎖長と競合プローブの有無が判定線の形成に著しい影響を及ぼすことから、比較的容易に至適反応条件を見出すことができるものと考えられる。

【0049】

ハイブリダイゼーションに際して、非標識の競合オリゴヌクレオチドを加えることによりハイブリダイゼーションプローブの特異性を増し、非特異的なハイブリダイゼーションを抑制することができる。

【0050】

本発明の検出法においては、正常塩基配列検出用ハイブリダイゼーションプローブと変異塩基配列検出用ハイブリダイゼーションプローブの標識に異なる標識物質を用い、正常塩基配列検出用の反応系と変異塩基配列検出用の反応系の2つを1つに統合してもよい。すなわち、正常塩基配列検出用ハイブリダイゼーションプローブと変異塩基配列検出用ハイブリダイゼーションプローブに異なった標識をしておき、1:1の比で混合して互いに競合させながら反応系を一つにまとめることが可能である。反応後、それぞれの標識に対して特異的に結合する物質と、集積したときに可視的な標識との複合体でアフィニティークロマトグラフィーを行って遺伝子型を判定する。

【0051】

本発明の検出法は、次のような利点を有する。(1) 汎用性: 検出法として長年にわたって汎用されてきたアレル特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを基にしているため、点変異はもちろんのこと、挿入・欠失などの塩基配列を伴う広範な変異の検出に対応できる。(2) 迅速性: サーマルサイクラーにより実施できる増幅およびハイブリダイゼーションの反応が終わってから、遺伝子型の判定まで10分以内に実施することができる。核酸増幅にキャピラリータイプのPCR増幅装置を用いることにより、DNA検体があれば1時間以内に全工程を終了することも可能である。(3) 簡便性: PCR反応後は、肉眼で遺伝子型を判定することができるため、ゲル電気泳動装置や蛍光検出装置などの機器を必要としない。PCR反応を行うサーマルサイクラーは、感染症検査などに用いられる汎用臨床検査機器であり、すでに多くの病院に設置されている。また、反応操作は

簡便であり、特殊な技能を要しない。上記の利点は、PCR以外の核酸増幅反応（TMA、NASBA、LAMPなど）を用いた場合にも得られる。

【0052】

本発明の検出法の原理を、PCRの場合を例として、図1～3を参照してさらに詳しく説明する。

【0053】

図1は正常DNAを検体として用いた場合の反応を示す。反応系1は正常塩基配列検出用ハイブリダイゼーションプローブを添加した系で、反応系2は変異塩基配列検出用ハイブリダイゼーションプローブを添加した系である。図中、黒丸は正常塩基、黒三角は変異塩基、Digはジゴキシゲニン標識、Bはビオチン標識、GPは金粒子を意味する。

【0054】

まず、点変異箇所を含む遺伝子部位（検出対象配列）をPCRによって増幅する。このときに用いる1対のPCRプライマーのうちの一方は、その5'端をあらかじめジゴキシゲニンで標識したものをを用いる。PCR反応液中には、通常の成分に加えて、さらに2種のオリゴヌクレオチド（ハイブリダイゼーションプローブおよび競合プローブ）を混和しておく。このオリゴヌクレオチドの組み合わせには、正常塩基配列検出用のものと変異塩基配列検出用のものの2種類が存在する。正常塩基配列検出用の組み合わせでは、その一方が正常塩基配列の点変異部位を中央部にもち、かつ3'端をビオチン標識したオリゴヌクレオチド（正常プローブ）であり、他方が、変異塩基配列の点変異部位を中央部にもつ非標識の競合オリゴヌクレオチド（変異プローブ）である。変異塩基配列検出用の組み合わせでは、その一方が、変異塩基配列の点変異部位を中央部にもち、かつ3'端をビオチン標識したオリゴヌクレオチド（変異プローブ）であり、他方が正常塩基配列の点変異部位を中央部にもつ非標識の競合オリゴヌクレオチド（正常プローブ）である。いずれのオリゴヌクレオチドも、ジゴキシゲニンで標識したPCRプライマーとは逆鎖になるように設計する。

【0055】

PCR反応液の組成は、例えば、検体DNA 50～100 ng、10 mM Tris-HCl (p

H 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、各250 μ MのdNTP、1 μ M PCRフォワードプライマー、1 μ M PCRリバープライマー（5' 端をジゴキシゲニン標識）、600 nM ハイブリダイゼーションプローブ（3' 端をビオチン標識）、3 μ M競合非標識オリゴヌクレオチド、1.25 U Taq DNAポリメラーゼとし、反応液量は20 μ lとする。PCRの条件は、例えば、まず94℃で2分間加熱し、98℃10秒-55℃30秒-72℃30秒のサイクルを35回繰り返した後、72℃3分、98℃3分、65℃1分、55℃1分、45℃1分、35℃1分、25℃1分とする。サイクルを繰り返した後のこの過程で、ジゴキシゲニンで標識されたPCR産物の持つ塩基配列に完全に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする。例えば、正常塩基配列を持つDNAに対して正常塩基配列検出用のオリゴヌクレオチドを組み合わせた場合は、ジゴキシゲニンで標識されたPCR産物とビオチンで標識されたオリゴヌクレオチドのハイブリッドが形成される（図1、反応系1）。この溶液5 μ lをDNA Detection test strip（ロシュ社、#1-965-484）などの、ストレプトアビジンが固定され、金コロイド標識抗ジゴキシゲニン抗体を展開可能に保持するアフィニティークロマト試験片の試料適用部位にスポットし、下端をバッファーに5秒間浸し、室温のままで5分間放置してバッファーを展開すると、金コロイド標識抗ジゴキシゲニン抗体がジゴキシゲニン標識PCR産物-ビオチン標識オリゴヌクレオチドのハイブリッドに結合し、このハイブリッドがさらに試験片に固定されたストレプトアビジンに捕捉され、赤いラインを形成するのを肉眼的にとらえることができる。一方、正常塩基配列を持つDNAに対して変異塩基配列検出用のオリゴヌクレオチドを組み合わせた場合は、ジゴキシゲニンで標識されたPCR産物と非標識オリゴヌクレオチドのハイブリッドが形成される。この溶液を試験片の試料適用部位にスポットしてバッファーで展開すると、金コロイド標識抗ジゴキシゲニン抗体がジゴキシゲニン標識PCR産物-非標識オリゴヌクレオチドのハイブリッドに結合するものの、このハイブリッドは試験片上のストレプトアビジンに捕捉されないため、赤いラインを形成しない（図1、反応系2）。以上のように2種類の反応系のそれぞれにおける赤いラインの形成を肉眼的に観察することにより、検体となるDNAの遺伝子型を判定することが可能となる。変異塩基配列を持つDNAにおいても、同様の反応原理である（図2）。

【0056】

この態様の操作手順を図3に示す。まず、検体とするDNAと反応試薬をPCRチューブ内で混和し、サーマルサイクラーでプログラムに従い過熱・冷却を行ってDNAの増幅およびハイブリッド形成を行う（ステップ1）。反応液から5 μ lをとって、試験片の試料適用部位にスポットし、試験片の下端をバッファーに浸した後、室温に放置する（ステップ2）。5分後、遺伝子型判定ラインの有無によって判定を行う（ステップ3）。アフィニティークロマトグラフィーが正常に完了したか否かはコントロールラインの有無によって確認できる。

【0057】

本発明の検出法は、遺伝子変異の有無を迅速かつ簡便に、そして特別な装置を用いずに確実に判定できる方法であり、病院の外来診療やベッドサイドで遺伝子検査を行うのに適している。すなわち、ポイント・オブ・ケアとしての遺伝子診断を可能にするものである。具体的には、CYP2C19をはじめとする薬物代謝酵素の遺伝子多型を判定し、ある薬剤がその患者にとって適切かどうかをその場で判定したり、処方量の調整に役立てたりすることが可能である。この場合、短時間に検査結果が得られることが重要な利点となる。

【0058】

<2>本発明のキット

本発明のキットは、DNAポリメラーゼを用いて、変異部位を含む検出対象塩基配列を含むDNAの増幅を行うためのプライマーと、検出対象塩基配列に相補的である塩基配列を有するハイブリダイゼーションプローブと、アフィニティークロマトグラフィー用試験片とを含むキットであって、

DNAの増幅に用いるプライマーの少なくとも一つは、増幅されたDNAが第1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識されており、ハイブリダイゼーションプローブは第2の標識物質により標識され、ハイブリダイゼーションプローブの有する塩基配列は、DNAの増幅を阻害しないように設定されており、試験片は第1の標識物質および第2の標識物質を利用して増幅されたDNAとハイブリダイゼーションプローブとのハイブリッドを検出できるものであることを特徴とする。本発明のキットは、本発明の検出法を実施するために

使用できる。

【0059】

プライマー、ハイブリダイゼーションプローブ、および、アフィニティークロマトグラフィー用試験片は、本発明の検出法に関し上記に説明した通りである。

【0060】

本発明のキットは、変異部位が点変異である場合には、標識されたハイブリダイゼーションプローブの塩基配列と点変異の位置において1塩基異なる塩基配列を有しかつ標識されていないオリゴヌクレオチド（競合プローブ）をさらに含むことが好ましい。このオリゴヌクレオチドは、本発明の検出法に関し上記に説明したとおりである。

【0061】

【実施例】

次に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、下記実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げたものであり、これによって本発明の範囲が何ら限定されるものではない。

【0062】

【実施例1】 糖原病Ia型g727t変異の検出

(1) 反応系および操作手順

糖原病Ia型g727t変異の検出のため、変異部位の周辺の既知の塩基配列に基づき、表1に示すプライマーを調製した。

【0063】

【表1】

糖原病Ia型g727t変異検出用のプライマーおよびプローブ

PCRフォワードプライマー (G6P-E5-1F-Dig)

5'-Dig-CCCAAATCCTTCCTATCTCTCACAG-3' (配列番号1)

PCRリバープライマー (G6P-E5-1R(20))

5'-TGCTGGAGTTGAGAGCCAGC-3' (配列番号2)

【0064】

また、プローブの鎖長の検討のため、ハイブリダイゼーションプローブおよび

競合プローブとして表2に示すオリゴヌクレオチドを調製した。

【0065】

【表2】

1) 正常塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド

17mer: 5'-AAGCTGAACAGGAAGAA-Biotin-3' (配列番号3)

15mer: 5'-AGCTGAACAGGAAGA-Biotin-3' (配列番号4)

13mer: 5'-GCTGAACAGGAAG-Biotin-3' (配列番号5)

11mer: 5'-CTGAACAGGAA-Biotin-3' (配列番号6)

2) 正常塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド

17mer: 5'-AAGCTGAAAAGGAAGAA-3' (配列番号7)

15mer: 5'-AGCTGAAAAGGAAGA-3' (配列番号8)

13mer: 5'-GCTGAAAAGGAAG-3' (配列番号9)

11mer: 5'-CTGAAAAGGAA-3' (配列番号10)

3) 変異塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド

17mer: 5'-AAGCTGAAAAGGAAGAA-Biotin-3' (配列番号11)

15mer: 5'-AGCTGAAAAGGAAGA-Biotin-3' (配列番号12)

13mer: 5'-GCTGAAAAGGAAG-Biotin-3' (配列番号13)

11mer: 5'-CTGAAAAGGAA-Biotin-3' (配列番号14)

4) 変異塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド

17mer: 5'-AAGCTGAACAGGAAGAA-3' (配列番号15)

15mer: 5'-AGCTGAACAGGAAGA-3' (配列番号16)

13mer: 5'-GCTGAACAGGAAG-3' (配列番号17)

11mer: 5'-CTGAACAGGAA-3' (配列番号18)

【0066】

PCR反応液の組成は、検体DNA 50~100 ng、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、各250 μMのdNTP、1 μM PCRフォワードプライマー、1

μ M PCRリバープライマー（5' 端をジゴキシゲニン標識）、600 nM ハイブリダイゼーションプローブ（3' 端をビオチン標識）、所定濃度の競合非標識オリゴヌクレオチド、1.25 U Taq DNAポリメラーゼとし、反応液量は20 μ lとした。PCRの条件は、まず94℃で2分間加熱し、98℃10秒-55℃30秒-72℃30秒のサイクルを35回繰り返した後、72℃3分、98℃3分、65℃1分、55℃1分、45℃1分、35℃1分、25℃1分とした。

【0067】

この溶液5 μ lを試験片（DNA Detection Test Strip、ロシュ社、#1-965-484、ストレプトアビジンが固定され、金コロイド標識抗ジゴキシゲニン抗体を展開可能に保持するアフィニティークロマト試験片）の試料適用部位にスポットし、下端をバッファーに5秒間浸し、室温のままで5分間放置してバッファーを展開した。放置後、遺伝子型判定線の有無を肉眼的に判定した。

【0068】

（2）非標識オリゴヌクレオチドによる競合の検討

標識ハイブリダイゼーションプローブを17merとし、競合プローブを反応液中に添加せずに検出を行った。検体とするDNAはg727アレルのホモ接合子（正常DNA）とt727アレルのホモ接合子（変異DNA）を用い、ハイブリダイゼーションプローブとしては正常塩基配列検出用のものと変異塩基配列検出用のものを用いた。結果を図4に示す。図中、DNAに関するWtおよびMutはそれぞれ正常DNAおよび変異DNAを示し、ハイブリダイゼーションプローブに関するWtおよびMutはそれぞれ正常塩基検出用および変異塩基配列検出用を示す（以下の図5～7においても同様である）。

【0069】

いずれの組み合わせでも赤い反応ラインが認められる偽陽性が出現し、遺伝子型を決定することができなかった（図4、レーン1～4）。

【0070】

競合プローブ(17mer)を反応液中にハイブリダイゼーションプローブの5～50倍量（モル濃度）添加して同様の実験を行った。結果を図5に示す。

【0071】

競合プローブの添加により偽陽性の反応が著しく減少した。すなわち、正常DNAに対する変異塩基配列検出用プローブの反応系（図5、レーン6～8）および変異DNAに対する正常塩基配列検出用プローブの反応系（同、レーン10～12）において、ごくわずかな赤い反応ラインを認めるのみであった。偽陽性反応の抑制効果はいずれの添加量においても差異を認めず、50倍量の添加でも偽陽性の反応を完全に抑制することはできなかった。一方、25～50倍量の添加では、本来の陽性反応を抑制しやや反応ラインが薄くなる傾向を認めた（同、レーン3、4、15および16）。

【0072】

（3）ハイブリダイゼーションプローブの鎖長の検討

ハイブリダイゼーションプローブおよび競合プローブとして17mer、15mer、13mer、11merのものを使用して検討を行った。ここでは、競合プローブの反応液添加量をハイブリダイゼーションプローブの30倍に固定した。結果を図6に示す。

【0073】

正常DNAに対する変異塩基配列検出用プローブの反応系において、15merではわずかな偽陽性が出現し（図6、レーン4）、13merと11merでは消失した（同、レーン5および6）。変異DNAに対する正常塩基配列検出用プローブの反応系では、15mer、13mer、11merのいずれにおいても偽陽性は消失した（同、レーン7～9）。しかしながら、11merでは本来の陽性反応が減弱する傾向を認めた（同、レーン3および12）。

【0074】

以上の検討に基づいて、ハイブリダイゼーションプローブおよび競合プローブの鎖長を12mer（表3）とし、競合プローブの添加量を5倍として、正常DNA（g727アレルのホモ接合子）、保因者DNA（g727アレルとt727アレルのヘテロ接合子）、患者DNA（t727アレルのホモ接合子）を対象に、上記のように検出を行った。結果を図7に示す。

【0075】

遺伝子型と完全に一致する結果が得られ、十分な陽性の反応ラインが観察され

た(図7、レーン1および4)一方、偽陽性はまったく認められなかった(レーン2および3)。

【0076】

【表3】

正常塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド(GSD727-ASO-W12-Bio)

5'-GCTGAACAGGAA-Biotin-3' (配列番号19)

正常塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド(GSD727-ASO-M12)

5'-GCTGAAAAGGAA-3' (配列番号20)

変異塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド(GSD727-ASO-M12-Bio)

5'-GCTGAAAAGGAA-Biotin-3' (配列番号21)

変異塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド(GSD727-ASO-W12)

5'-GCTGAACAGGAA-3' (配列番号22)

【0077】

【実施例2】 中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症のa985g変異、高グリシン血症GLDC遺伝子のg1691t変異、薬剤代謝酵素遺伝子CYP2C19のg681a、アルデヒド脱水素酵素2のGlu487Lys多型の点変異の検出

中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症のa985g変異、高グリシン血症GLDC遺伝子のg1691t変異、薬剤代謝酵素遺伝子CYP2C19のg681a、アルデヒド脱水素酵素2のGlu487Lys多型の点変異について、本発明の検出法による点変異の検出を行った。

【0078】

それぞれの点変異の存在部位を含む塩基配列を増幅するPCRプライマーは、PCR反応におけるアニール温度が55℃で増幅が行えるように、鎖長を調節した。また、ハイブリダイゼーションプローブは、Tm値が35～40℃となるように設計した。結果として、鎖長は、10mer～15merとなった。また、競合プローブは、プライマー、ハイブリダイゼーションプローブおよび競合プローブの塩基配列を表4に示す。

【0079】

【表4】

1) 中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症遺伝子a985g変異検出用のプライマーおよび

プローブ

PCRフォワードプライマー(Dig-MCAD-F1):

5'-Dig-CTTTTAAATTCTAGCACCAAGCAATATC-3' (配列番号 23)

PCRリバースプライマー(Dig-MCAD-R1):

5'-Dig-TCCAAGTATCTGCACAGCAT-3' (配列番号 24)

正常塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド(Bio-MCAD985-W13)

5'-GCAATGAAAGTTG-Biotin-3' (配列番号 25)

正常塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド(MCAD985-M13)

5'-GCAATGGAAGTTG-3' (配列番号 26)

変異塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド(Bio-MCAD985-M12)

5'-AACTTCCATTGC-Biotin-3' (配列番号 27)

変異塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド(MCAD985-W12)

5'-AACTTTCATTGC-3' (配列番号 28)

2) GLDC遺伝子g1691t変異検出用のプライマーおよびプローブ

PCRフォワードプライマー(Dig-GLDC-F)

5'-Dig-GTCTCTTGGTCCTACCTAATA-3' (配列番号 29)

PCRリバースプライマー(GLDC-R)

5'-TTAGTGAAGCTAGAACACTG-3' (配列番号 30)

正常塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド(Bio-S564I-W13)

5'-GACGAACTGTTCA-Biotin-3' (配列番号 31)

正常塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド(S564I-M13)

5'-GACGAAATGTTCA-3' (配列番号 32)

変異塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド(Bio-S564I-M)

5'-GACGAAATGTTCA-Biotin-3' (配列番号 33)

変異塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド(S564I-W)

5'-GACGAACTGTTCA-3' (配列番号 34)

3) CYP2C19遺伝子CYP2C19*2多型検出用のプライマーおよびプローブ

PCRフォワードプライマー (CYP2C19-P1)

5'-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3' (配列番号 35)

PCRリバースプライマー (Dig-CYP2C19-P2)

5'-Dig-AATATCACTTTCCATAAAAGCAAG-3' (配列番号 36)

正常塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド (Bio-CYP2C19-W)

5'-TCCCGGGAAC-Biotin-3' (配列番号 37)

正常塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド (CYP2C19-M)

5'-TTCCCAGGAAC-3' (配列番号 38)

多型塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド (Bio-CYP2C19-M)

5'-TTCCCAGGAAC-Biotin-3' (配列番号 39)

多型塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド (CYP2C19-W)

5'-TCCCGGGAAC-3' (配列番号 40)

4) アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子多型検出用のプライマーおよびプローブ

PCRフォワードプライマー (Dig-ALDH2-AF)

5'-Dig-CAAATTACAGGGTCAACTGCTATGA-3' (配列番号 41)

PCRリバースプライマー (Dig-ALDH2-AR2)

5'-Dig-AGCAGGTCCTGAACTTCCAGCAG-3' (配列番号 42)

正常塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド (Bio-ALDH2-PW2)

5'-Biotin-ATACACTGAAGTGA-Biotin-3' (配列番号 43)

正常塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド (ALDH2-CM2)

5'-ATACACTAAAGTGA-3' (配列番号 44)

多型塩基配列検出用ビオチン標識オリゴヌクレオチド (Bio-ALDH2-PM2)

5'-Biotin-ATACACTAAAGTGAA-Biotin-3' (配列番号 45)

多型塩基配列検出用非標識競合オリゴヌクレオチド (ALDH2-CW2)

5'-ATACACTGAAGTGAA-3' (配列番号 46)

【0080】

上記プライマーおよびプローブを用いることの他のPCRの条件やプローブの濃度等の条件は、上記のいずれの変異の検出においてもすべて実施例1と同じであ

った。

【0081】

これらの条件下で、検出を行ったところ、全ての検出系において正しい遺伝子型の判定が可能であった（図8のa、b、cおよびd）。アルデヒド脱水素酵素2のGlu487Lys多型検出においては、変異塩基配列を検出するための反応系において反応ラインが薄いため、競合非標識オリゴヌクレオチドを反応系に混和しないようにしたところ、十分な反応ラインの形成が観察された。いずれの反応においても、偽陽性は認められなかった。

【0082】

サーマルサイクラーにおける反応が終了してから、遺伝子型判定までに要する時間は10分以内であった。また、この試験片をそのまま乾燥させたものは、室温に保存した場合、少なくとも2年後でも肉眼的な判定が可能であった。

【0083】

以上の結果から、本発明の検出法によって、プライマーならびにハイブリダイゼーションプローブおよび競合プローブの設計および反応条件は、個々の遺伝子変異に応じて若干の調整が必要であるものの、5つの遺伝子における各変異・多型を、簡便・迅速に検出し、検体DNAの遺伝子型を確定できることが示された。従って、本発明の検出法は汎用性を持つものであると認められる。

【0084】

【発明の効果】

本発明によれば、通常のサーマルサイクラー以外に特殊な機器や装置を用いずに、簡便・迅速・確実に、病因遺伝子変異の同定や、疾患関連遺伝子および薬剤代謝酵素遺伝子の多型の検出を行うことができる。本発明の検出法は、ベッドサイドでの検出を可能にし、オーダーメイド医療を容易にする手法であると考えられる。

【0085】

【配列表】

<110> 松原 洋一(Yoichi Matsubara)

呉 繁夫(Shigeo Kure)

株式会社三菱化学ビーシーエル(Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.)

<120> 遺伝子変異検出法

<130> P-B0250

<160> 46

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

cccaaattcct tcctatctct cacag

25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

tgctggagtt gagagccagc

20

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 3

aagctgaaca ggaagaa

17

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 4

agctgaacag gaaga

15

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 5

gctgaacagg aag

13

<210> 6

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 6

ctgaacagga a

11

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 7

aagctgaaaa ggaagaa

17

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 8

agctgaaaag gaaga

15

<210> 9

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 9

gctgaaaagg aag

13

<210> 10

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 10

ctgaaaagga a

11

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 11

aagctgaaaa ggaagaa

17

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 12

agctgaaaag gaaga

15

<210> 13

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 13

gctgaaaagg aag

13

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 14

ctgaaaagga a

11

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 15

aagctgaaca ggaagaa

17

<210> 16

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 16

agctgaacag gaaga

15

<210> 17

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 17

gctgaacagg aag

13

<210> 18

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 18

ctgaacagga a

11

<210> 19

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 19

gctgaacagg aa

12

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 20

gctgaaaagg aa

12

<210> 21

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 21

gctgaaaagg aa

12

<210> 22

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 22

gctgaacagg aa

12

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 23

ctttttaatt ctagcaccaa gcaatatc

28

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 24

tccaagtatc tgcacagcat

20

<210> 25

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 25

gcaatgaaag ttg

13

<210> 26

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 26

gcaatggaag ttg

13

<210> 27

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 27

aacttccatt gc

12

<210> 28

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 28

aactttcatt gc

12

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 29

gtctcttggc cctaccta a

21

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 30

ttagtgaagc tagaactg

20

<210> 31

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 31

gacgaactgt tca

13

<210> 32

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 32

gacgaaatgt tca

13

<210> 33

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 33

gacgaaattg tca

13

<210> 34

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 34

gacgaactgt tca

13

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 35

aattacaacc agagcttggc

20

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 36

aatatcactt tccataaaag caag

24

<210> 37

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 37

tcccgggaac

10

<210> 38

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 38

ttcccaggaa c

11

<210> 39

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 39

ttcccaggaa c

11

<210> 40

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 40

tcccgggaac

10

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 41

caaattacag ggtcaactgc tatga

25

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 42

agcaggtcct gaacttccag cag

23

<210> 43

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 43

atacactgaa gtga

14

<210> 44

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 44

atacactaaa gtga

14

<210> 45

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 45

atacactaaa gtgaa

15

<210> 46

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 46

atacactgaa gtgaa

15

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の検出法の原理（正常DNAを検体とした場合）の説明図である。

【図 2】 本発明の検出法の原理（変異DNAを検体とした場合）の説明図である。

【図 3】 本発明の検出法の一例の操作の説明図である。

【図 4】 17merのハイブリダイゼーションプローブを用いた場合の検出結果（クロマトグラムの写真）を示す。

【図 5】 17merのハイブリダイゼーションプローブを用い、競合プローブを添加した場合の検出結果（クロマトグラムの写真）を示す。

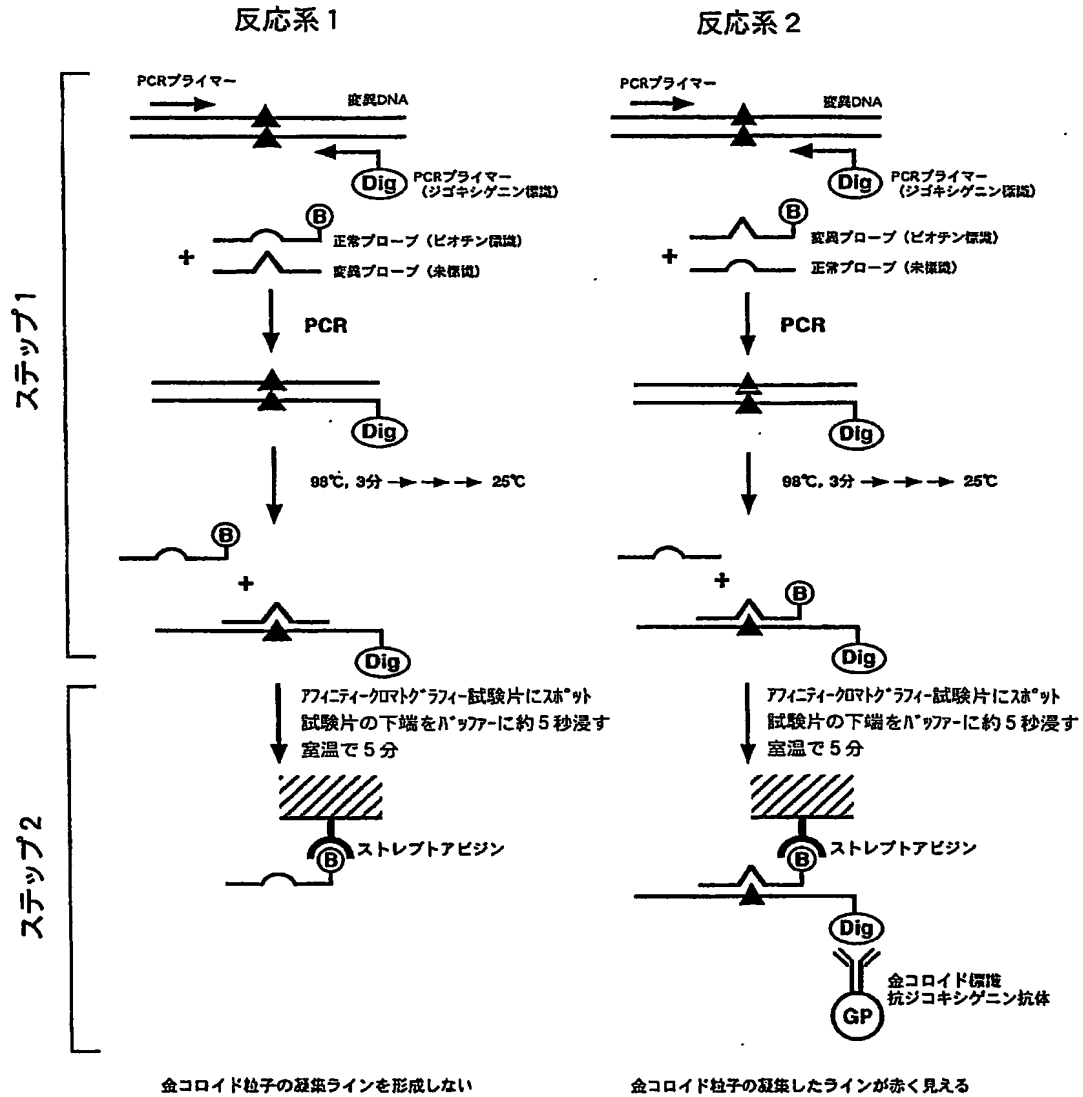
【図 6】 種々の長さのハイブリダイゼーションプローブを用い、競合プローブを添加した場合の検出結果（クロマトグラムの写真）を示す。

【図 7】 12merのハイブリダイゼーションプローブを用い、競合プローブを添加した場合の検出結果（クロマトグラムの写真）を示す。

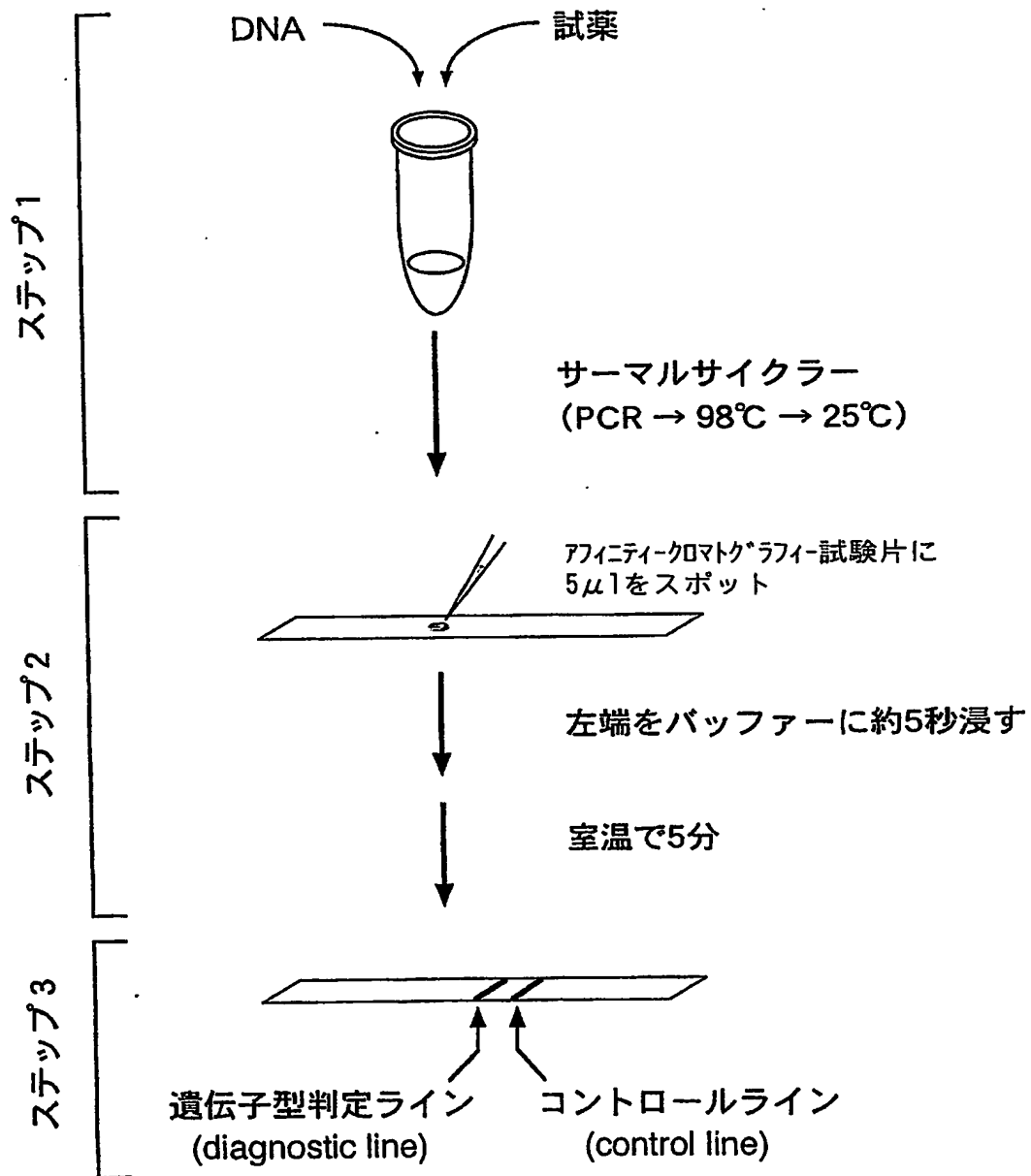
【図 8】 種々の変異に関する検出結果（クロマトグラムの写真）を示す。

【図 2】

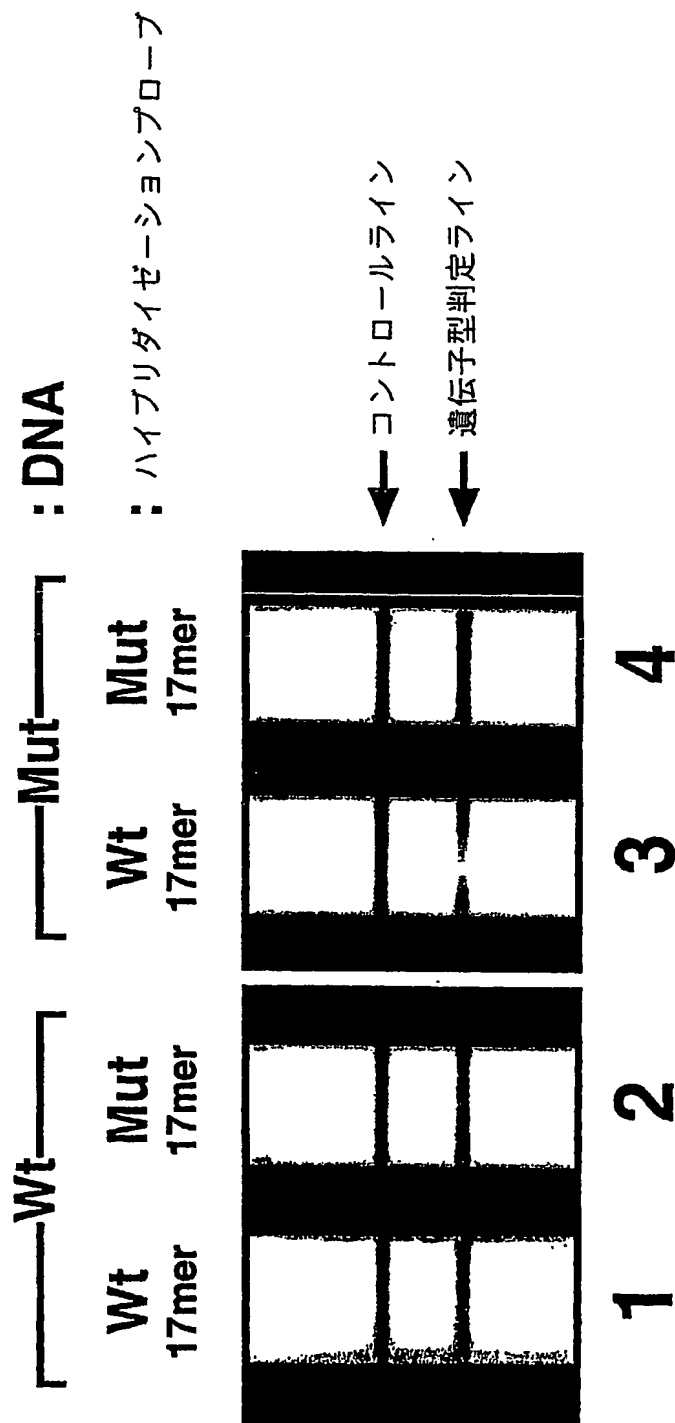
変異DNAを検体とした場合



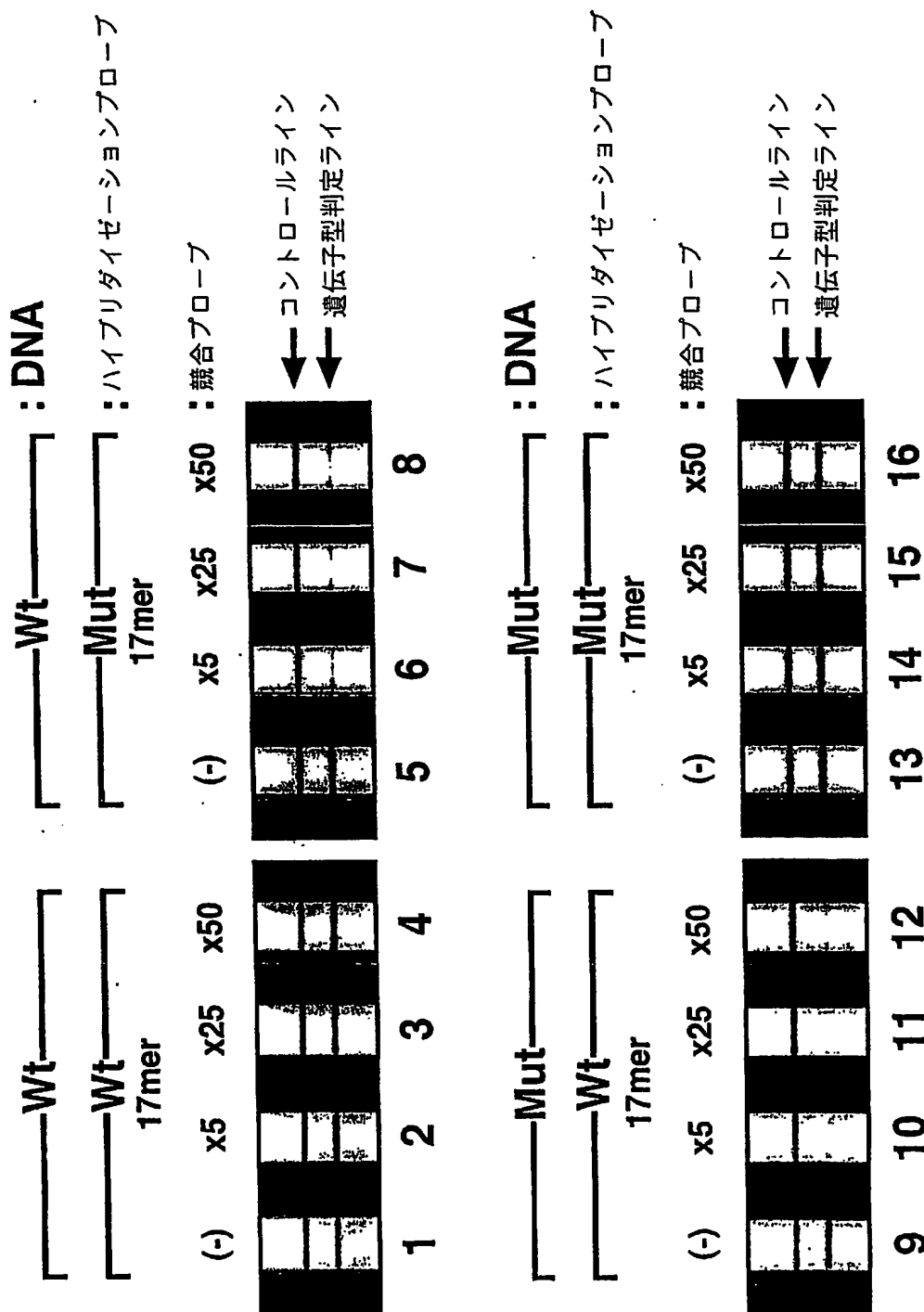
【図3】



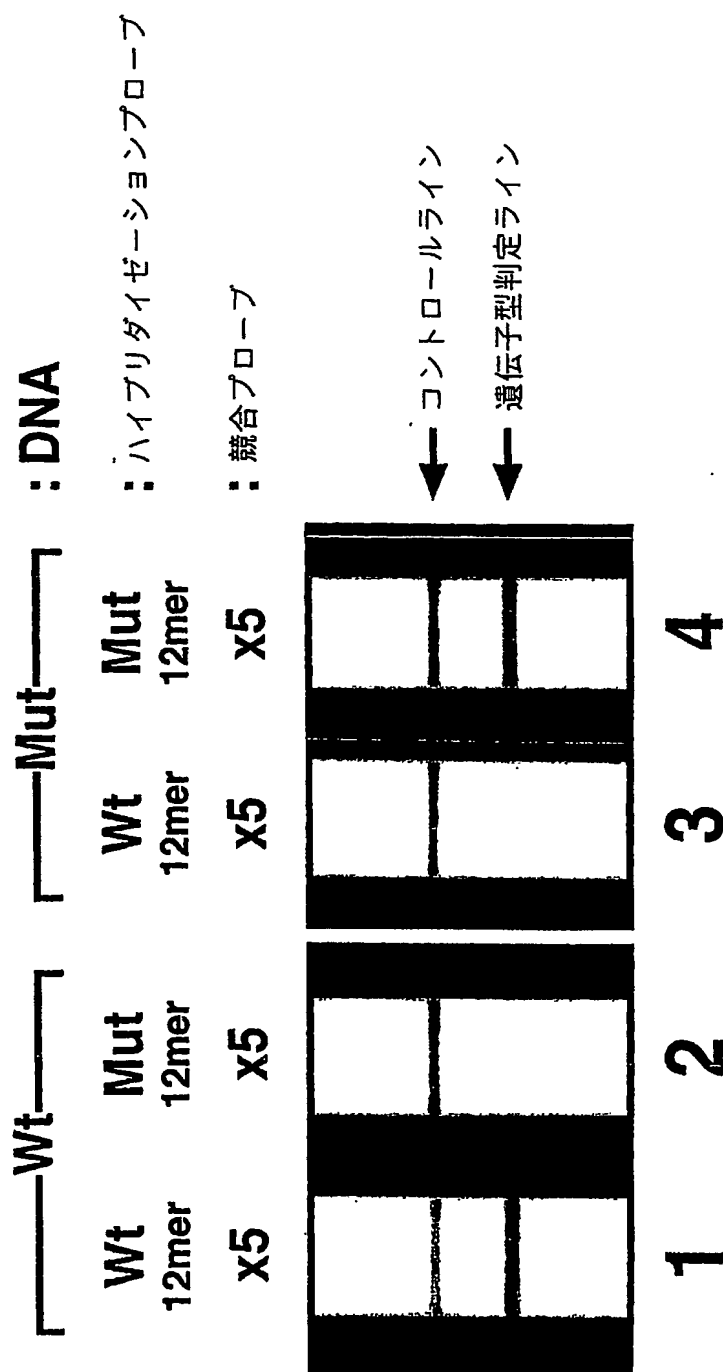
【図 4】



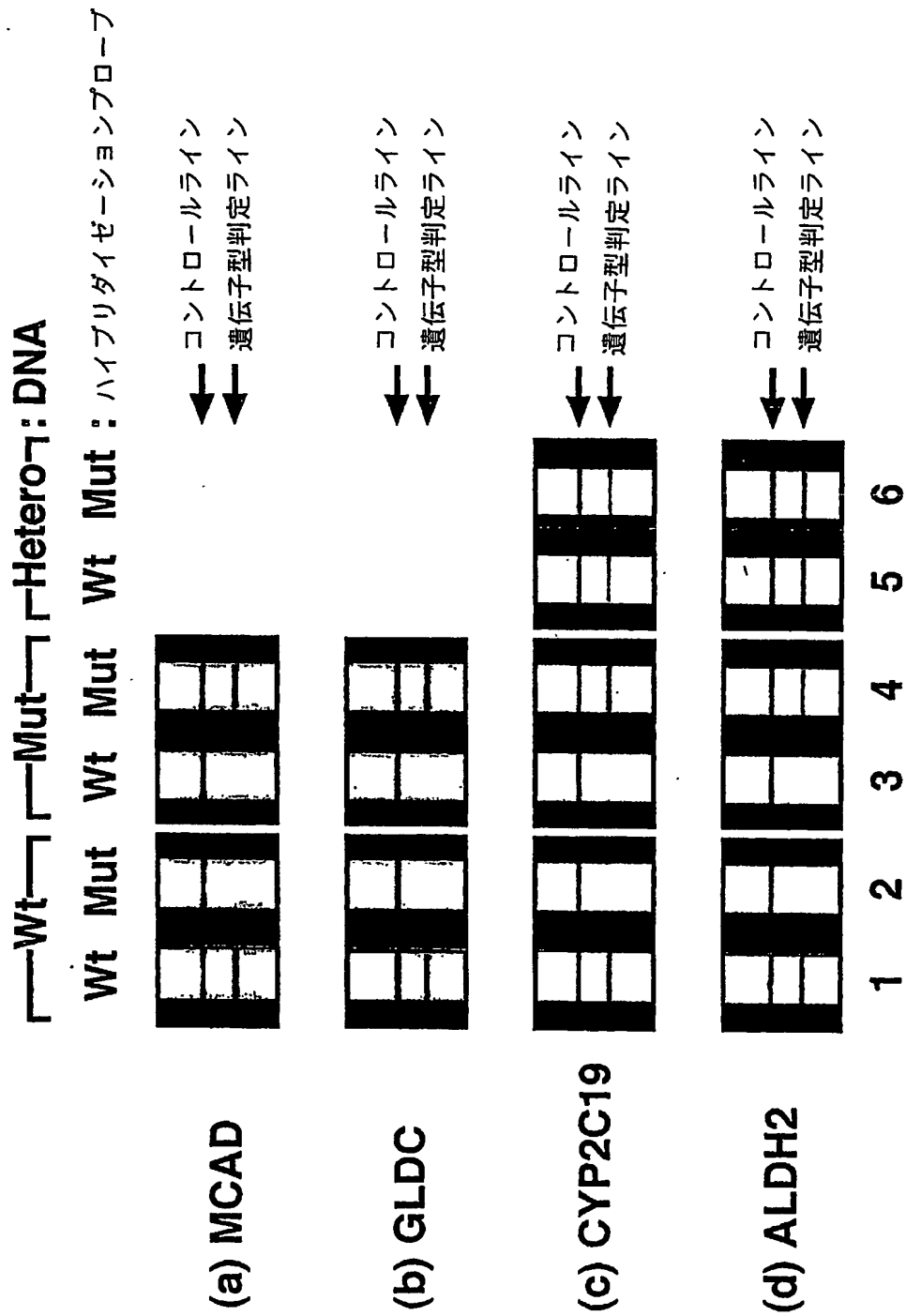
【図 5】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子の変異の簡便かつ迅速な検出法を提供する。

【解決手段】 DNAの増幅に用いるプライマーの少なくとも一つが、増幅されたDNAが第1の標識物質により標識されるように第1の標識物質により標識されており、ハイブリダイゼーションプローブが第2の標識物質により標識されるとともに、DNAの増幅が行われる反応液に含まれており、ハイブリダイゼーションプローブの有する塩基配列が、DNAの増幅を阻害しないように設定されており、ハイブリッドの検出が第1の標識物質および第2の標識物質を利用してアフィニティークロマトグラフィーにより行われることにより、DNAの増幅のためのプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを含む一つの反応系で、DNAの増幅およびハイブリダイゼーションを順次行い、反応液中のハイブリッドをアフィニティークロマトグラフィーにより検出する。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 3 2 3 4 1 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 1 2 2 9 5 6]

- | | |
|----------|-----------------------|
| 1. 変更年月日 | 1 9 9 1 年 5 月 1 0 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 東京都板橋区志村 3 - 3 0 - 1 |
| 氏 名 | 株式会社三菱油化ビーシーエル |
| | |
| 2. 変更年月日 | 1 9 9 4 年 1 0 月 2 0 日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 東京都板橋区志村 3 - 3 0 - 1 |
| 氏 名 | 株式会社三菱化学ビーシーエル |

特願 2 0 0 2 - 3 2 3 4 1 9

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[5 0 2 4 0 3 6 2 6]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 1 月 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

宮城県仙台市太白区恵和町 1 3 - 1 0

氏 名

松原 洋一

特願 2 0 0 2 - 3 2 3 4 1 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 4 0 4 9 1 1]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 1 月 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

宮城県仙台市青葉区葉山町 3 - 2 0 - 3 1 2

氏 名

呉 繁夫

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.